



Universidad de Buenos Aires



Facultad de Farmacia y Bioquímica

***“El rol de p66shc en la homeostasis mitocondrial durante el
envejecimiento”***

Hernán Pérez

Tesis presentada para optar al título de

Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Subárea temática: Ciencias Biológicas

Director: Dra. María Cecilia Carreras

Director adjunto: Dr. Juan José Poderoso

Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM) - CONICET

Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno

Hospital de Clínicas “José de San Martín”

Av. Córdoba 2351, 9° piso, Ciudad Autónoma de Buenos Aires

AÑO 2018

1	ABREVIATURAS.....	1
2	RESUMEN	2
3	INTRODUCCIÓN	1
3.1	LAS TEORÍAS DEL ENVEJECIMIENTO.	1
3.2	LA MITOCONDRIA.....	5
3.2.1	Genoma mitocondrial	6
3.2.2	La estructura mitocondrial	7
3.2.3	La respiración mitocondrial (Fosforilación Oxidativa)	8
3.2.4	Complejos redox mitocondriales	9
3.2.5	Las especies reactivas del oxígeno (ROS) y su detoxificación.	11
3.2.6	Morfología y dinámica mitocondrial	13
3.3	EL ÓXIDO NÍTRICO.....	17
3.3.1	Las óxido nítrico sintasas	20
3.3.2	Isoformas de NOS	21
3.4	p66 ^{SHC} Y LA FAMILIA DE PROTEÍNAS SHC.....	23
3.4.1	Mecanismo de acción de p66shc en la mitocondria	24
3.5	SIRT3, UNA SIRTUINA MITOCONDRIAL.....	25
4	HIPÓTESIS.....	27
5	OBJETIVOS	27
6	MATERIALES y MÉTODOS.....	28
6.1	Colonia de ratones y Bioética.....	28
6.2	Oligonucleótidos	30
6.3	Obtención de homogenatos, citosol y mitocondrias purificadas.....	31
6.4	Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.	32
6.4.1	Preparación del reactivo.....	32
6.4.2	Curva de calibración	32

6.4.3	Ensayo de muestras, controles y <i>pooles</i>	33
6.5	SDS-PAGE y Western Blot para detección de proteínas.....	33
6.5.1	Preparación de las muestras.....	33
6.5.2	Electroforesis.....	33
6.5.3	Transferencia a membrana de PVDF.....	33
6.5.4	Inmunodetección de proteínas.....	34
6.5.5	Inmunoprecipitación de proteínas.....	34
6.6	Medición del consumo de O ₂ mitocondrial.....	35
6.7	Ensayos enzimáticos.....	35
6.7.1	Medición de actividad de NOS.....	35
6.7.2	Medición de peróxido de hidrógeno en mitocondrias.....	36
6.7.3	Medición de la actividad de SOD.....	36
6.7.4	Medición de la actividad de Catalasa.....	37
6.7.5	Actividad de la actividad de Sirt3.....	37
6.7.6	Medición de la actividad de la enzima citrato sintasa.....	37
6.7.7	Medición de la actividad del complejo I (NADH-ubiquinona reductasa).....	38
6.7.8	Medición de actividad de Succinato-ubiquinona – citocromo c reductasa (Complejos II-III).....	38
6.7.9	Medición de la actividad de citocromo <i>c</i> oxidasa (Complejo IV).....	38
6.7.10	Preparación de citocromo <i>c</i> reducido.....	38
6.8	Aislamiento de células a partir de tejido cerebral.....	39
6.9	Ensayos de citometría de flujo.....	39
6.9.1	Producción mitocondrial de NO.....	39
6.9.2	Producción intracelular de especies reactivas del oxígeno (ROS), de superóxido y de masa mitocondrial.....	39
6.9.3	Determinación del potencial de membrana mitocondrial.....	40
6.10	Relación mitocondrial NAD/NADH y contenido de ATP.....	40
6.10.1	Relación mitocondrial NAD/NADH.....	40

6.10.2	Contenido de ATP.....	40
6.11	Morfología mitocondrial.....	40
6.12	Protocolo de extracción de ADN total.....	41
6.13	Protocolo de extracción de ARNm.....	41
6.14	Real time RT-PCR.....	41
6.14.1	PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).....	42
6.14.2	Determinación de la relación ADNmt/ADNa.....	44
6.14.3	Corrida electroforética en gel de agarosa 2%	44
6.15	Análisis estadísticos.....	44
7	RESULTADOS.....	45
7.1	Establecimiento y <i>evaluación</i> de la colonia de ratones p66shc(-/-).....	45
7.2	El estado redox y la producción de ROS son inversamente regulados en mitocondrias aisladas de tejido nervioso de ratones WT y p66shc ^(-/-) durante el envejecimiento.....	47
7.3	La actividad de nNOS y la producción de RNS están alteradas en el tejido nervioso de ratones p66 ^{shc(-/-)} longevos.....	54
7.4	Los cambios en el balance ROS/RNS durante el envejecimiento del tejido nervioso de ratones p66 ^{shc(-/-)} modifican parámetros metabólicos mitocondriales.....	58
7.5	La biomasa mitocondrial, la morfología y la ultraestructura se modifican en el envejecimiento del tejido nervioso de ratones p66 ^{shc(-/-)}	63
7.6	La ausencia de p66shc altera la homeostasis de la dinámica mitocondrial en el envejecimiento.....	68
7.7	La actividad de Sirt3 puede ser regulada a través de nitración por ONOO ⁻	72
8	DISCUSIÓN.....	76
9	CONCLUSIONES.....	87
10	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	89
11	BIBLIOGRAFIA.....	91

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a mi familia y sobre todo a mis padres que estuvieron siempre acompañando, apoyando y brindando ese cariño incondicional que en todo momento recibí en la vida.

A mi viejo que desde chico me transmitió su pasión por la ciencia, siempre fuiste un ejemplo de genialidad y sabiduría.

A mi mamá que desde su perfil social y humano me enseñó a escuchar y a sentir empatía con las personas. Nunca me dejaste bajar los brazos, brindándome confianza y voluntad en los momentos de desconcierto.

A Guada, mi hermana, con la que puedo contar siempre, un fiel reflejo de todos los valores y principios que nuestros padres nos inculcan.

A mis Abuelos, que formaron la familia hermosa que hoy disfrutamos. A Benito, un ejemplo de tenacidad, a él le debo mi espíritu emprendedor. A la ñata por ser la típica abuela que te daba todos los gustos y su cariño. A la abuela Olga, que sin perder su elegancia nos cuidó y ayudó a criar. Ella nos enseñó a compartir siempre anteponiendo nuestro bienestar al suyo.

A Nati, mi norte, mi luz, mi compañera, sin vos todo es más feo y más difícil. No existen palabras para explicar lo agradecido que estoy de poder contar con tu cariño y apoyo. Vos me enseñaste que no hay límites para amar y que siempre hay margen para mejorar y aprender.

A mis amigos, Nico y Ezequiel, "la comisión directiva". A ellos les debo horas, meses, años y hasta décadas de cursadas codo a codo. Crecimos y transitamos juntos este camino de alegrías y frustraciones. A Carolina, por los momentos vividos y bancarme incluso en nuestras diferencias, me enseñaste la importancia de consensuar y la autocrítica.

Al Bocha, a Juani y a Juampí, por la visión de la vida que solo un ingeniero puede dar. En su amistad encontré respuestas a preguntas e inquietudes que llevaba dentro.

A Juanjo por brindarse, por estar siempre ahí, por todo lo compartido, lo lindo, lo feo, lo malo y lo triste. Por hacerme sentir parte de su familia.

A Yael por ser de fierro, por estar siempre y por ayudar en cada una de las etapas de este proyecto. Me mostraste que no importa cuántas veces nos caigamos siempre podemos levantarnos.

A Paola con su humor ácido y corazón gigante compartimos consejos, vivencias y momentos de felicidad y tristeza.

A mis compañeros de laboratorio. Inés por su calidez y ayuda. Mariana por intentar aprender a quererme y a Mónica por impulsarme a terminar y así dejar de ser “casi” doctor.

Al Doctor Poderoso y a la Doctora Carreras, que me dieron la oportunidad de trabajar en este laboratorio depositando su confianza en mí para la realización de este proyecto dandome total libertad para poder llevarlo a cabo. Ambos siempre estuvieron presentes estrechando lazos que trascienden lo científico, cultivando nuestro vínculo a través de compartir ideales y pensamientos.

A Podesolo tengo palabras de admiración, me siento honrado de haber sido parte de su grupo de trabajo. En él siempre encontré donde debatir e intercambiar ideas y conocimientos. Con su inteligencia, energía y calidez supo motivarme en los peores momentos.

A Ceci, por nunca rendirse en transmitir su mirada crítica y ordenada. Por saber qué es necesario en cada momento a partir de su experiencia como científica y como mujer. Por las palabras de aliento y cariño, pero también por los retos. Gracias por haberme guiado por este difícil camino, por estar siempre, por enseñarme a moverme en este ambiente y por su respeto y confianza.

1 ABREVIATURAS

- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- ADNn:** ADN nuclear
- ADNc:** ADN copia
- ADNmt:** ADN mitocondrial
- ARN:** Ácido ribonucleico
- ARNm:** ARN mensajero
- ATP:** Adenosina tri-fosfato
- Bcl xL:** Linfoma de células B extra largo
- Bcl-2:** Proteína 2 de linfoma de células B
- BSA:** Suero albúmino bovino
- DNasa:** Desoxirribonucleasa
- dNTP:** Deoxinucleótido trifosfato
- Drp-1:** Proteína relacionada con la dinamina
- ECL:** Quimioluminiscencia aumentada
- EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético
- EGF:** Factor de crecimiento epidérmico
- EGTA:** Ácido etilenglicoltetraacético
- EI:** Espacio Intermembrana
- ERK1/2:** Proteína quinasa de regulación extracelular
- ETC:** Cadena de transporte de electrones
- FACS:** Fluorescence-activated cell sorter analysis
- FAD:** Flavina adenina dinucleótido
- H₂O₂:** Peróxido de hidrógeno
- HSP:** Proteínas de shock térmico
- IF:** Inmunofluorescencia
- IGF:** Factor de crecimiento tipo insulina
- IP:** Inmunoprecipitación
- L-NAME:** Ng-nitro-L-arginina metil éster
- MEM:** Membrana externa mitocondrial
- Mfn:** Mitofusina
- MIM:** Membrana interna mitocondrial
- MM:** Matriz mitocondrial

MMI: Metimazol
MnSOD: SOD mangánica
MOMP: permeabilización mitocondrial de la membrana externa
NF- κ B: Factor nuclear kappa B
NMDAR: Receptores de N-metil-D-aspartato
nNOS: Óxido nítrico sintasa neuronal
NO: Óxido nítrico
NOS: Óxido nítrico sintetasa
NRF: Factor respiratorio nuclear
Nrf2: Factor nuclear factor 2 relacionado con el factor 2 eritroide
O₂: Superóxido
OH: Hidroxilo
ONOO⁻: Peroxinitrito
Opa1: Proteína de artrofia optica 1
p66shc: Proteína adaptadora SHC isoforma 1 de 66 kDa
PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS: *Buffer* fosfato salino
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PGC-1: coactivator-1 PPAR γ
PI3K: Fosfatidilinositol 3 quinasa
PKC: Proteína quinasa C
PKG: Proteína quinasa G
PMSF: Fenil metil sulfonil fluoruro
RC: Restricción calórica
ROS: Especies reactivas del oxígeno
SD: Desviación estándar
SDS: Duodecil sulfato de sodio
Sirt3: Sirtuina 3
SNC: Sistema nervioso central
SOD: Superóxido dismutasa
TAE: Tris acetato EDTA
Tfam: Factor de transcripción mitocondrial A
Tg: Tiroglobulina
TNF: Factor de necrosis tumoral

Abreviaturas

TOM: Translocasa de membrana externa

TSP: Teorías de senescencia programada

TAE: Teorías de acumulación de errores o daño

UCP: Proteína desacoplante

UQ: Ubiquinona

UQH: Ubisemiquinona

UQH: Ubiquinol

VDAC: Canal aniónico dependiente de voltaje

2 RESUMEN

La proteína adaptadora p66shc ha demostrado que los genes reguladores del envejecimiento y las especies reactivas del oxígeno (ROS) están estrechamente interconectados. Su ausencia modifica la homeostasis metabólica proporcionando resistencia al estrés oxidativo y promoviendo la longevidad. En este estudio, las mitocondrias de tejido nervioso de ratones envejecidos p66^{shc(-/-)} presentan una alteración reducida del equilibrio redox con una disminución tanto en la generación de ROS como en su desintoxicación. Demostramos un fuerte vínculo entre las especies reactivas de nitrógeno y la función, morfología y biogénesis mitocondrial. Bajos niveles de formación de peroxinitrito resultan en una menor nitración de las proteínas mitocondriales de ratones p66^{shc(-/-)} envejecidos, retrasando la pérdida de funciones biológicas característica del proceso de envejecimiento. Sirt3 modula la biología mitocondrial asociada a la edad y la función a través de la desacetilación de proteínas. Mostramos que su actividad depende de su estado de nitración y que altos niveles de NAD, como los observados en mitocondrias de ratones p66^{shc(-/-)} durante el envejecimiento, retrasarían el declive de su función. Los bajos niveles de nitración y acetilación de proteínas en estos ratones podrían ser responsables de prevenir el desbalance de la homeostasis metabólica durante el envejecimiento, aumentando la esperanza de vida.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 LAS TEORÍAS DEL ENVEJECIMIENTO

Se ha registrado un aumento en la población de más de 65 años a nivel mundial, y considerando que la mayor longevidad conlleva a un aumento exponencial del riesgo de cáncer, enfermedades cardiovasculares y trastornos neurodegenerativos (Miller R., 1999), la comprensión de la biología del envejecimiento es imprescindible para mejorar la calidad de vida de los adultos mayores. La Organización Mundial de la Salud OMS define al envejecimiento como la consecuencia de la acumulación de una gran variedad de daños moleculares y celulares a lo largo del tiempo, que conlleva a un descenso gradual de las capacidades físicas y mentales, a un aumento del riesgo de enfermedad, y finalmente a la muerte. Ahora bien, esos cambios no son lineales ni uniformes, y su vinculación con la edad de una persona en años es más bien relativa, ya que mientras algunos octogenarios disfrutan de una excelente salud y se desenvuelven perfectamente, otros son frágiles y necesitan ayuda considerable.

El envejecimiento es una temática muy difícil de abordar para la investigación experimental. En primer lugar, es un proceso difuso que afecta a muchos sistemas y tejidos diferentes a la vez y en segundo lugar, el envejecimiento es un proceso a largo plazo. Un experimento para determinar si una droga suprime un patógeno particular podría llevarse a cabo en cuestión de días, en cambio, un experimento para determinar si la esperanza de vida de un mamífero se modifica a partir de un protocolo determinado podría tomar años o décadas. Estudios recientes permiten distinguir entre la edad biológica y la edad temporal de un organismo en cualquier momento de su estadio de vida a través del análisis de marcadores epigenéticos (Mitnitski A. B., 2018).

A pesar de los continuos avances en la comprensión de los procesos biológicos, el envejecimiento sigue siendo un fenómeno misterioso y poco comprendido que puede surgir como cambios que ocurren en un tejido en particular o en forma paralela en distintos tejidos a la vez. En las últimas décadas han surgido interesantes teorías que intentan explicar cómo se producen los cambios que conllevan al envejecimiento, pero ninguna de ellas logra por sí sola responder de forma satisfactoria dicho fenómeno (Jin K., 2010). Las mismas pueden ser agrupadas en dos principales categorías, las teorías de senescencia programada (TSP) o las teorías de acumulación de errores o daño (TAE). Las TSP proponen que del mismo modo que

el reloj biológico controla el desarrollo o la pubertad, existe una programación genética por la que a través de cambios en la expresión de genes se ven afectados los sistemas de defensa, reparación y mantenimiento celular en el envejecimiento. Las TAE, en cambio, consideran a los reiterados insultos ambientales y a los subproductos metabólicos como los responsables de la acumulación de daños al ADN, proteínas y lípidos que causan la pérdida de funciones biológicas con la posterior muerte del organismo.

Las TSP pueden resumirse en tres subcategorías. **1) Longevidad programada:** el envejecimiento es el resultado de la activación e inhibición de ciertos genes de acuerdo a un patrón de desarrollo normal definido para cada organismo, siendo la última etapa dentro de una secuencia de eventos codificados en el genoma (Davidovic M., 2010). En 1961, el Dr. Hayflick teorizó que la capacidad de las células humanas para dividirse se limitaba a aproximadamente 50 veces, después de lo cual simplemente dejaban de dividirse (la teoría del límite de Hayflick del envejecimiento) (Hayflick L., 1961). Según la teoría de los telómeros, los telómeros han demostrado experimentalmente que se acortan con cada división celular sucesiva (Campisi J., 2000). Cuando los telómeros alcanzan una longitud crítica, la célula deja de replicarse a un ritmo apreciable, y por lo tanto muere, lo que eventualmente conduce a la muerte de todo el organismo. Ciertas tipos celulares, como el óvulo y los espermatozoides, utilizan la telomerasa para restaurar la longitud de los telómeros hasta el final de su cromosoma, asegurando que las células puedan seguir reproduciéndose. La mayoría de las células adultas carecen de esta capacidad. La telomerasa no puede prevenir completamente el acortamiento de los telómeros después de reiteradas divisiones en células madre, proporcionando un límite en la capacidad replicativa de estas células con un posterior deterioro progresivo en el mantenimiento de la homeostasis de los órganos en las edades avanzadas (Flores I., 2005; Herbig U., 2006). Un estudio más reciente muestra que los telómeros se acortan con la edad en las células madre neuronales del hipocampo y que los ratones deficientes en telomerasa exhiben una neurogénesis reducida así como la alteración de la diferenciación neuronal y la neuritogénesis (Ferron S. R., 2010). **2) Teoría endocrina:** el reloj biológico actúa a través de hormonas que regulan el ritmo del envejecimiento. Algunos estudios señalan a la vía de señalización insulina/IGF-1 (Factor de crecimiento insulínico de tipo 1) clave en la regulación hormonal del envejecimiento (van Heemst D., 2010) **3) Teoría inmunológica:** el Sistema inmune disminuye su actividad con el paso del tiempo incrementando la vulnerabilidad de los organismos a enfermedades y al envejecimiento. Se ha descrito que el sistema inmune muestra su mejor *performance* durante la pubertad para luego mermar con el paso del tiempo. Si bien este declive

puede afectar los resultados de muchas enfermedades, como las infecciones postoperatorias, la diabetes, las infecciones del tracto urinario y enfermedades cardiovasculares o neurodegenerativas como el Alzheimer, no se ha logrado implicar al sistema inmune como el responsable directo (Conelius E., 1972; Rozemuller A. J., 2005).

Por otra parte, a las TAE las podemos agrupar en 4 subcategorías. **1) Teoría del desgaste:** las células y los tejidos tienen partes vitales que se desgastan por el uso repetido dando como resultado el envejecimiento y luego la muerte. Esta teoría fue introducida en 1882 por el Dr. August Weismann, un biólogo alemán, e incluso hoy en día para muchas personas suena perfectamente razonable, ya que es lo que le sucede a la mayoría de los objetos de uso cotidiano a nuestro alrededor. **2) Teoría de la tasa de vida:** en 1908, el fisiólogo Max Rubner descubrió una relación entre la tasa metabólica, el tamaño del cuerpo, y la longevidad. En su trabajo explicó que la especie animal “duradera” es la más grande y gasta menos calorías por gramo de masa de cuerpo que la especie más pequeña y “efímera”. La hipótesis del consumo de la energía indica que los animales nacen con una cantidad limitada de alguna sustancia, de energía potencial, o de capacidad fisiológica y que cuanto más rápido se utiliza, más rápido se morirán (Hayflick L., 1994). Más tarde, esta hipótesis evolucionó en la teoría de la tasa de vida que establece que cuanto más rápida es la tasa metabólica, más rápida es la actividad bioquímica, y por lo tanto más rápido envejecerá un organismo (Brys K., 2007) Es decir, el envejecimiento es el resultado del ritmo de vida que llevan los organismos. **3) Teoría de *cross-linking*:** de acuerdo con esta teoría propuesta por Johan Bjorksten en 1968, la acumulación de proteínas *cross-linkeadas* daña células y tejidos, ralentizando los procesos biológicos y resultando en el envejecimiento (Bjorksten J., 1968). Estudios más recientes muestran que las reacciones de *cross-linking* están implicadas en cambios relacionados con la edad en las proteínas estudiadas (Bjorksten J., 1990). **4) Por último, la teoría del envejecimiento por radicales libres,** desarrollada en 1956 por Denham Harman, discute sobre la acumulación del daño provocado por ROS (Harman D., 1956). Esta teoría propone que el superóxido y el H_2O_2 generados durante la respiración mitocondrial causan y acumulan daños en los componentes macromoleculares de la célula, siendo responsables de la pérdida de funciones biológicas y del envejecimiento. Las macromoléculas tales como ácidos nucleicos, lípidos, azúcares y proteínas son susceptibles a ser oxidadas por radicales libres. Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden obtener una base adicional o un grupo de azúcar al romper la doble cadena y unirse con otras moléculas. Hay diferentes tipos de enzimas antioxidantes capaces de degradar las ROS en componentes inertes mediante una serie de reacciones químicas (Ames B. N., 1981). La simple

presencia de estas enzimas encargadas de prevenir el daño por ROS es un fuerte indicador de que estas sustancias son biológicamente importantes (de Magalhaes J. P. y Church G. M., 2006). La evidencia experimental más fuerte a favor de esta teoría surge de estudios hechos en *Drosophila melanogaster*, donde la sobre expresión de la SOD citosólica y de la catalasa aumentan en un 34% la longevidad de los animales y demoran el proceso de envejecimiento (Orr W. C. y Sohal R. S., 1994). Asimismo, ciertas cepas longevas de *Drosophila* (Hari R., 1998) y de *Caenorhabditis elegans* (Larsen P. L., 1993) tienen niveles altos de enzimas antioxidantes. Por otro lado, los ratones transgénicos que sobreexpresan el gen de tioredoxina presentan un aumento en la resistencia al estrés oxidativo y extienden la longevidad en un 35% (Mitsui A., 2002). A su vez, los ratones que sobreexpresan catalasa viven un 18% más que el grupo control (Schriner S. E., 2005).

Dado que las ROS son el resultado del metabolismo celular, la teoría de envejecimiento por radicales libres está asociada a la teoría de la tasa de vida (Harman, 1981). Uno de los mecanismos propuestos surge a partir del aumento en la esperanza de vida de animales bajo tratamiento de restricción calórica (RC). Hasta el día de hoy este es el modelo más eficiente para lograr aumentar la expectativa de vida de los organismos. En los modelos de RC se modula la actividad mitocondrial y se observa menor daño por radicales libres (Weindruch R., 1996; Masoro E. J., 2005 Lopez-Luch G., 2016). Una hipótesis alternativa es que la generación de ROS por la mitocondria, independientemente de la tasa metabólica o de los niveles de antioxidantes, puede actuar como un determinante de la longevidad (Sohal R. S. y Brunk U. T., 1992; Barja G., 2002). Algunos resultados sugieren que el grado de ROS generados en las mitocondrias en tejidos post-mitóticos puede ayudar a explicar las diferencias en la vida de algunos animales, en particular entre mamíferos (Ku H. H., 1993; Barja G. y Herrero A., 2000; Sohal R. S., 2002)

Desde la década de 1930, se sabe que la restricción calórica puede prolongar la esperanza de vida en los animales de laboratorio (McCay C. M., 1935). Desde entonces, se realizaron muchos estudios intentando dilucidar los mecanismos subyacentes, pero no fue hasta hace poco que el grupo de Michael Ristow proporcionó pruebas de que este efecto se debe al aumento de la formación de radicales libres dentro de las mitocondrias causando una inducción secundaria en la capacidad de defensa antioxidante (Schulz T. J., 2007). Hallazgos recientes discuten los efectos de la restricción calórica en modelos de roedores sobre ciertos genes y proteínas en el envejecimiento, particularmente los papeles de FOXO, AMPK y sirtuinas (Shimokawa I., 2010).

Aunque se han propuesto varias teorías sobre el envejecimiento, en la actualidad no existe un consenso sobre este tema. Muchas de las teorías propuestas interactúan entre sí de una manera compleja. Estudiar el alcance de cada una de ellas y su interrelación nos permitirá en el futuro acercarnos a una comprensión global y más completa de este fenómeno multifactorial que afecta a todos los organismos vivientes. Para poder profundizar en estos complejos mecanismos biológicos asociados a la progresión del envejecimiento es necesario comprender la estructura y fisiología de la mitocondria así como su rol en la homeostasis celular y en el organismo en general.

3.2 LA MITOCONDRIA

El término mitocondria proviene del griego antiguo *μίτος* (“hilo”) y *“χονδρίον”*, diminutivo de *“χόνδρος”*, “grano”, por las estructuras alargadas que tienen en su interior y por su pequeño tamaño dentro de la célula. El término fue acuñado originalmente en alemán por el microbiólogo Carl Benda en 1898. El descubrimiento de las mitocondrias fue un hecho colectivo y el gran número de términos que se refieren a éstas es prueba de ello: Blefaroplasto, condrioconto, condriómitos, condroblastos, condriosomas, condriosferas, fila, gránulos fucsínofilicos, Korner, Fadenkörper, mitogel, cuerpos parabasales, vermículas, sarcosomas, cuerpos intersticiales, plasmosomas, plastocondrios, bioplastos son algunos de los más conocidos.

Las mitocondrias son organelas altamente dinámicas que se encuentran en el citoplasma celular y son la principal fuente productora de energía (ATP) en la célula a través de la fosforilación oxidativa de diferentes sustratos (Mitchell P. y Moyle J., 1967). Las mismas son de herencia materna, autorreplicantes y se encuentran en casi todas las células eucariotas. Fueron descritas por primera vez en 1890 por el patólogo alemán Altmann, quien las consideró como pequeñas unidades de funcionamiento autónomo a las que llamó bioplastos e incluso llegó a pensar que podían ser bacterias, aunque sus experimentos fueron considerados un artefacto y rechazados inicialmente. Veinte años más tarde, en 1913, Otto Heinrich Warburg descubrió su asociación con las enzimas de la cadena respiratoria, y en 1934 fueron aisladas por primera vez a partir de homogeneizados de hígado. Pero no fue hasta 1948 que Hogeboom, Schneider y Palade establecieron definitivamente a la mitocondria como el lugar donde se produce la respiración celular.

Lynn Margulis en 1981 propuso la teoría endosimbionte de su origen. Esta teoría plantea esencialmente que algunas de las organelas de las células eucariotas, en particular las mitocondrias y los plastos, fueron en su momento organismos procariontes de vida libre que probablemente tras haber sido fagocitados, no fueron digeridos y por el contrario, se acoplaron de tal manera que establecieron una relación simbiótica (mutualismo) con la célula hospedadora. Debido a su similitud con algunas bacterias de vida libre existentes hoy en día, se ha llegado a especular que los plastos derivarían de cianobacterias y las mitocondrias de bacterias como las rickettsias. Esta teoría postula que los ancestros de las mitocondrias fueron bacterias de vida independiente que desarrollaron la capacidad de utilizar el oxígeno eficientemente.

3.2.1 Genoma mitocondrial

El Genoma mitocondrial humano está constituido por una molécula circular de ADN (ADNmt) de solamente 16.569 pares de bases (16 kpb). En general, en la mayoría de las células se encuentran varios cientos de mitocondrias y cada una contiene entre 2 y 10 moléculas de ADN, por lo que el número de copias de ADNmt en cada célula es de varios miles. El mismo está compuesto por dos cadenas, una pesada (*heavy*) rica en guanina y otra liviana (*light*) rica en citosina. En la Figura 1 podemos observar el mapa genético mitocondrial que codifica para 37 genes, de los cuales 13 sintetizan subunidades de los complejos de la cadena de transporte de electrones, 22 ARNs de transferencia (tARNs) y 2 ARNs ribosomales (rARN).

Estos genes no se encuentran todos sobre la misma cadena codificadora, sino que existen genes localizados sobre ambas cadenas (H y L), aunque la mayoría son transcritos utilizando como molde la cadena H. Cada cadena tiene su propio origen de replicación y de transcripción, y se transcriben en una sola pieza; es decir, se produce una sola molécula de ARN que se denomina transcritos primario de esa cadena. El promotor de la transcripción de la cadena H se encuentra entre las posiciones 531 y 568. Este promotor dirige la formación del complejo de transcripción que formará la burbuja donde se sintetiza el ARN denominado transcritos primario de la cadena H. La replicación del ADN mitocondrial se produce predominantemente en las fases S y G₂, pero puede producirse durante todo el ciclo celular y en forma independiente del crecimiento o la división de la organela.

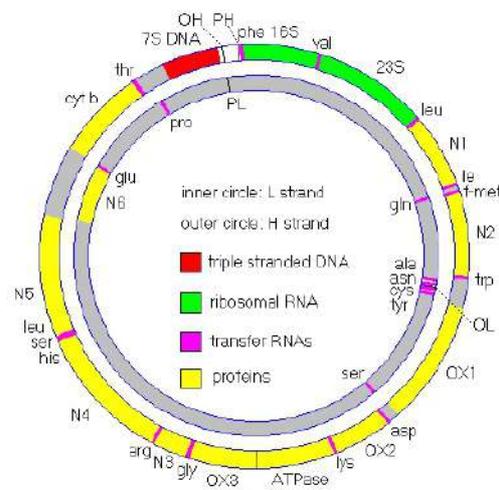


Figura 1. Genoma mitocondrial humano.

3.2.2 La estructura mitocondrial

Las mitocondrias pueden dividirse y fusionarse entre sí con facilidad en procesos complejos que describiremos más adelante. Su morfología es muy cambiante y puede variar desde largas estructuras ramificadas a pequeños elipsoides según el tipo celular o el estado funcional de la célula. Sin embargo, la estructura básica es la misma. Palade, en 1952, describió la membrana mitocondrial interna y externa, que difieren en composición y propiedades físico-químicas. La **Membrana Externa Mitocondrial (MEM)** se compone de fosfolípidos y proteínas, una de las principales es una proteína de transporte llamada porina. La membrana externa es permeable a iones, nutrientes, ATP, ADP. La **Membrana Interna Mitocondrial (MIM)** se compone también de fosfolípidos y proteínas, pero presenta un fosfolípido especial llamado cardiolipina que contribuye a la permeabilidad selectiva del oxígeno, CO₂ y agua, por lo que dispone de numerosos transportadores. Además, en esta membrana se lleva a cabo la fosforilación oxidativa encontrándose el complejo ATP-sintasa y la cadena de transporte de electrones. Tanto en la MEM como en la MIM hay proteínas que forman los complejos necesarios para importar aquellas proteínas mitocondriales que son sintetizadas en el citosol. En la membrana externa se encuentra el complejo de translocación de membrana externa (TOM) y en la membrana interna el complejo de translocación de membrana interna (TIM).

A su vez, dichas membranas delimitan el Espacio Intermembrana (EI) y la Matriz Interna (MI). La membrana interna proyecta expansiones tubulares hacia la matriz denominadas crestas. Mediante tomografía electrónica se observó que la membrana interna se une en la base de las crestas por *cristae junctions* (Renken C., 2002) de manera que, si bien el

interior de la cresta posee espacio intermembrana, se produce una compartimentalización estructural y funcional.

El **Espacio Intermembrana (EI)**, con una composición similar al citosol, tiene una alta concentración de protones como resultado del bombeo de los mismos por los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria. En este espacio se localizan la adenilato quinasa y la creatina quinasa, enzimas que intervienen en la transferencia del enlace de alta energía del ATP.

La **Matriz mitocondrial (MM)**, espacio delimitado por la membrana interna y de composición menos acuosa que el citosol, alberga la mayoría de los complejos enzimáticos asociados al metabolismo mitocondrial que no son de membrana y al genoma mitocondrial. En la matriz, a su vez, tiene lugar el ciclo de ácidos tricarboxílicos, la oxidación de ácidos grasos, carbohidratos, biosíntesis de urea y del grupo hemo y la síntesis de proteínas dependientes del genoma mitocondrial, entre otros procesos.

3.2.3 La respiración mitocondrial (Fosforilación Oxidativa)

La energía generada en forma de ATP por la glucólisis y el ciclo de ácidos tricarboxílicos no es suficiente para la vida de los organismos superiores. De este modo, a través del proceso de fosforilación oxidativa (OXPHOS) la célula es capaz de producir el 90% del ATP utilizado. Las fuentes de carbono se catabolizan mediante diferentes rutas metabólicas generando NADH y FADH₂. Estos dadores de electrones son oxidados y los electrones pasan a través de la **Cadena de Transporte de Electrones (ETC)** hasta el O₂, el cual es reducido para formar superóxido. Este proceso ocurre en la membrana mitocondrial interna mediante cuatro complejos principales, un quinto complejo o el llamado ATPasa, además de otras moléculas y proteínas accesorias. Las enzimas que catalizan estas reacciones redox tienen la capacidad de crear simultáneamente un gradiente de protones a través de la membrana, produciendo un estado altamente energético con el potencial de generar trabajo. El gradiente electroquímico tiene dos componentes, uno eléctrico formado por el potencial de membrana ($\Delta\psi$) y otro químico producido por el gradiente transmembrana de protones. Finalmente, la energía potencial de este gradiente es liberada cuando translocan pasivamente los protones hacia la matriz a través de las subunidades F₁-F₀ del complejo ATPasa o ATP sintasa y la energía liberada impulsa la conversión de ADP en ATP brindando un enlace de alta energía (Schaffer S. W., 2010) (Figura 2).

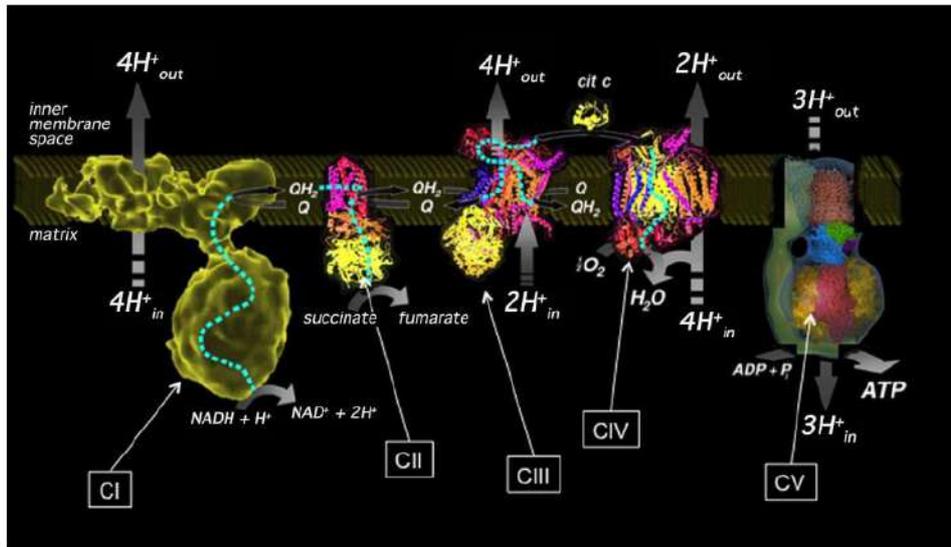


Figura 2. Cadena de transporte de electrones.

Se han identificado cuatro complejos enzimáticos unidos a membrana interna mitocondrial. Tres de ellos son complejos transmembrana, que están embebidos en la membrana interna, mientras que el otro está asociado a membrana. Los tres complejos transmembrana tienen la capacidad de actuar como bombas de protones. Evidencia reciente sugiere que estos complejos, a pesar de difundirse por la membrana, se encuentran agrupados en “supercomplejos” y hasta “megacomplejos” que brindarían mayor estabilidad y funcionalidad a los complejos individuales con la finalidad de agilizar el transporte de electrones, regular la formación de radicales de oxígeno o incrementar la eficiencia de producción de ATP, según sea requerido (Dudkina N. V., 2005) (Figura 3).

3.2.4 Complejos redox mitocondriales

El Complejo I (CI) o NADH:ubiquinona reductasa en vertebrados comprende 49 subunidades y su peso molecular es de alrededor de 900 KDa. Su función es captar dos electrones de la oxidación del NADH al NAD y transferirlos a un transportador liposoluble denominado ubiquinona (Q). El producto reducido, conocido con el nombre de ubiquinol (QH₂), difunde libremente por la membrana. Al mismo tiempo, el Complejo I transloca cuatro protones a través de membrana. Un inhibidor clásico es la rotenona que impide el paso de los electrones a la ubiquinona.

El Complejo II (CII) o succinato-ubiquinona reductasa está formado por cuatro subunidades y contiene flavina adenina dinucleótido (FAD), centros FeS y un grupo hemo. Es la única enzima del ciclo de Krebs asociada a membrana y no tiene la capacidad de bombear protones. Los electrones son transferidos por medio de una serie de centros FeS hacia Q. EL glicerol-3-fosfato y el acetyl-CoA también transfieren electrones a Q mediante vías diferentes en las que participan flavoproteínas.

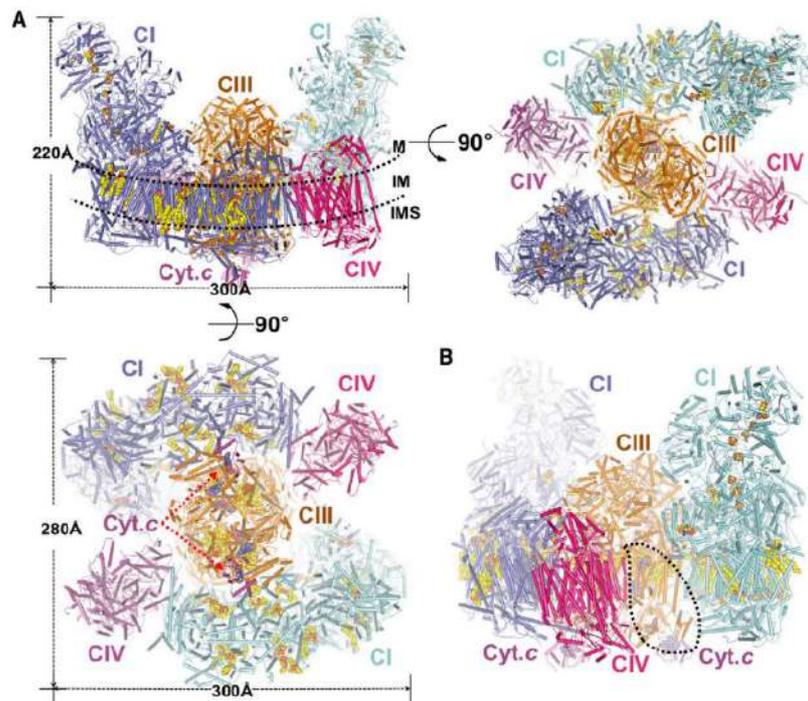


Figura 3. Esquema tridimensional de la conformación de los super/mega complejos

El Complejo III (CIII) o ubiquinol-citocromo c reductasa se compone de 12 subunidades y posee dos grupos hemo, uno de alto potencial (+90 mV) y otro de bajo potencial (-30 mV), y uno de dos ubiquinoles. Transfiere dos electrones desde QH₂ hacia dos moléculas de citocromo c (transportador de electrones hidrosoluble que se encuentra en el espacio intermembrana de la mitocondria) reduciéndolo y bombeando 4 H⁺. Presenta dos inhibidores químicos bien conocidos, antimicina y mixotiazol.

El Complejo IV (CIV) o citocromo c oxidasa se compone, en mamíferos, de 13 subunidades, 3 de ellas codificadas por el ADNmt captan cuatro electrones de cuatro moléculas de citocromo c y los transfieren al último receptor de la cadena, el oxígeno (O₂), para producir

dos moléculas de agua (H_2O). Al mismo tiempo, se translocan cuatro protones al espacio intermembrana. Tiene como inhibidores principales el cianuro y la azida que reaccionan con el grupo hemo $\alpha 3$; el CO, en cambio, compite con el O_2 por la unión al complejo de manera reversible. Los tres son inhibidores directos del transporte de electrones.

3.2.5 Las especies reactivas del oxígeno (ROS) y su detoxificación

Durante la respiración mitocondrial, la reducción incompleta del O_2 en la ETC produce la formación del anión superóxido (O_2^-). La mayoría de las especies reactivas del oxígeno derivan del O_2^- . Sin embargo, los organismos aeróbicos tanto en la mitocondria como en el citosol desarrollaron mecanismos antioxidantes para protegerse y contrarrestar los efectos nocivos del exceso de producción de estos agentes oxidantes. Dichos mecanismos se clasifican en enzimáticos y no-enzimáticos. Entre los no-enzimáticos encontramos al ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutatión (GSH), carotenoides y flavonoides, entre otros. Los mecanismos antioxidantes enzimáticos son las diferentes superóxido dismutasas (SOD), la catalasa, el sistema glutatión peroxidasa (GPx) y el sistema tiorredoxina.

Las ROS son moléculas inestables pero fisiológicamente necesarias para llevar a cabo procesos claves como la transducción de señales, la apoptosis, la proliferación celular y la expresión de genes; aunque altos niveles pueden fácilmente oxidar y dañar proteínas, ADN y lípidos provocando un desbalance de la homeostasis celular que conlleva a la pérdida de función biológica y al envejecimiento, entre otras patologías. De esta manera, el balance entre producción mitocondrial de ROS y su eliminación puede dirigir el destino celular (Tait S. y Green D. R., 2012; Chandel N.S., 2010; Finkel T., 2011).

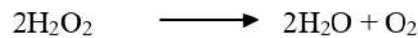
La mayor parte del O_2^- generado es vectorialmente liberado en la matriz mitocondrial donde la enzima MnSOD cataliza su dismutación a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Boveris A. y Cadenas E., 1997). El H_2O_2 difunde a través de las membranas mitocondriales donde las enzimas antioxidantes catalasa y GPx lo descomponen a H_2O . De esta manera, los niveles de ROS mitocondriales son un balance entre la tasa de producción por la ETC y la actividad de las enzimas antioxidantes.

Existen tres formas de superóxido dismutasa: la Mn-SOD (SOD2), que se localiza en la matriz mitocondrial y a diferencia de las demás no puede ser inhibida por cianuro o dietilditiocarbamato, la Cu,Zn-SOD (SOD1), que se localiza en el citoplasma celular y espacio intermembrana mitocondrial y la SOD extracelular (EC-SOD), que se encuentra unida a la

superficie de la célula por asociación de los carbohidratos de superficie en el espacio extracelular. Todas las superóxido dismutasas catalizan la reacción de conversión del O_2^- a H_2O_2 :



A su vez, el H_2O_2 puede ser eliminado por dos tipos de enzimas, las catalasas y las peroxidasas. La catalasa es una hemoproteína que se encuentra principalmente en los peroxisomas y puede ser inhibida de forma inespecífica por cianuro y HOCl y de forma específica por aminotriazol. La catalasa media directamente la descomposición del H_2O_2 generando O_2 y H_2O .



El sistema glutatión peroxidasa (GPx) consiste del par glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG), la glutatión reductasa y la glutarredoxina (GRX). Su distribución subcelular es complementaria a la de la catalasa, encontrándose principalmente en el citosol pero también es posible detectarla en mitocondria. La GPx no solo intercepta directamente a especies reactivas del oxígeno sino que también regula el estado redox intracelular utilizando el H_2O_2 para oxidar otros sustratos. La glutatión reductasa restablece los niveles de GSH al reducir el GSSG utilizando NADPH como agente dador de electrones; de esta manera, la relación GSH/GSSG se mantiene alta en condiciones normales (Figura 4).

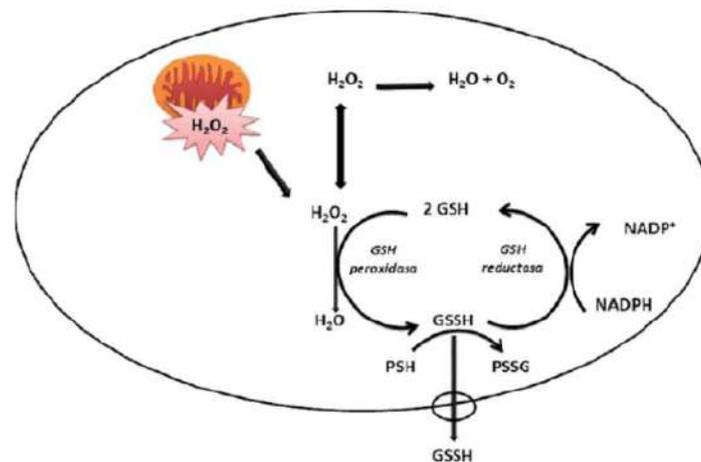


Figura 4. Esquema representativo del sistema GSH/GSSG

Por último, tenemos a las peroxirredoxinas (Prxs) y a las tiorredoxinas (Trxs). Estos sistemas se encuentran distribuidos por varios compartimientos subcelulares y ejercen su acción antioxidante a través de la reducción del H_2O_2 y de los hidroperóxidos orgánicos

(ROOH). Las Prxs son mantenidas en su forma reducida por el sistema tiorredoxina (Trx)/tiorredoxina reductasa (TrxR) que utiliza al NADPH como dador de electrones. Estos procesos tienen un rol importante en la regulación redox de varios procesos celulares que inducen el estrés oxidativo, tales como la síntesis de ADN, la proliferación celular y la apoptosis (Espinosa-Diez C., 2015) (Figura 5).

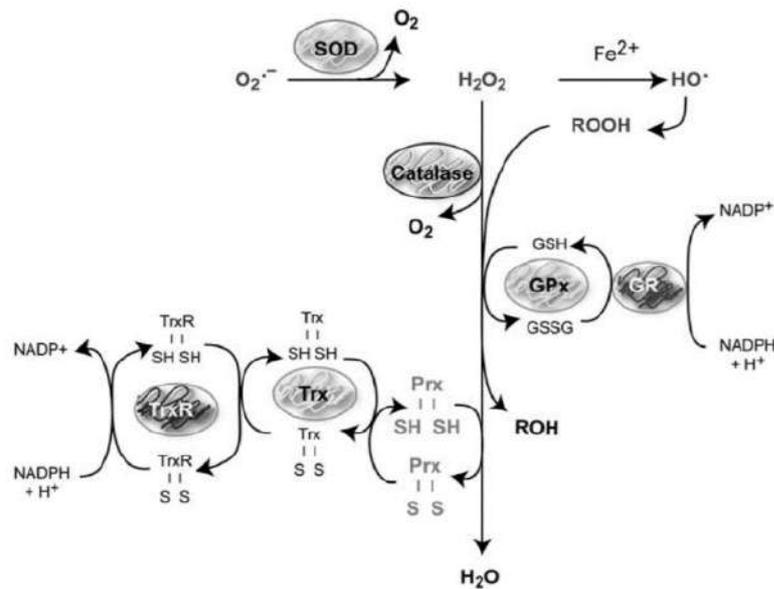


Figura 5. Esquema representativo de los mecanismos de detoxificación redox celular.

3.2.6 Morfología y Dinámica mitocondrial

Las mitocondrias son organelas móviles y altamente dinámicas que muestran un ciclo continuo de fisión y fusión (Westermann B., 2010; Chan D. C., 2012; Birsa N., 2013). Estos procesos llamados en su conjunto Dinámica mitocondrial son importantes para la herencia y las funciones mitocondriales. La dinámica mitocondrial, mediada por una extensa maquinaria proteica, en combinación con el estado de *swelling*, el crecimiento y la división de las organelas (biogénesis) y el proceso de depuración y eliminación de mitocondrias dañadas por mitofagia, determinan la morfología mitocondrial neta (Westermann B, 2010; Twig G. y Shirihai O. S., 2011; Picard M., 2013; Archer S. L., 2013). Las numerosas funciones celulares en las que se ve involucrada la mitocondria se reflejan en su estructura, las mismas no se encuentran aisladas sino formando una red interconectada. El desbalance de estos procesos puede dar como resultado la fragmentación mitocondrial debido a una fisión excesiva o a una fusión disminuida, pero también puede generar mitocondrias largas y altamente interconectadas en un escenario inverso (Sesaki H. y Jensen R. E., 1999; Zamponi N., 2018) (Figura 6).

Trabajos recientes demostraron que los cambios en el volumen mitocondrial y/o (ultra) estructura modifican la cinética de las reacciones bioquímicas y el ensamblaje de supercomplejos modificando la homeostasis mitocondrial (Lizana L., 2008; Dieteren C. E., 2011; Cogliati S., 2013; Mannella C. A., 2013). Aunque se hicieron muchos progresos durante la última década, todavía no está claro cómo el estado de la red y de las diversas morfologías mitocondriales está relacionado mecánicamente con las funciones mitocondriales. Esto podría estar asociado con el hecho de que varias proteínas de fusión y fisión también tienen otras funciones fuera de la dinámica mitocondrial (Zorzano A., 2010; Schrader M., 2012).

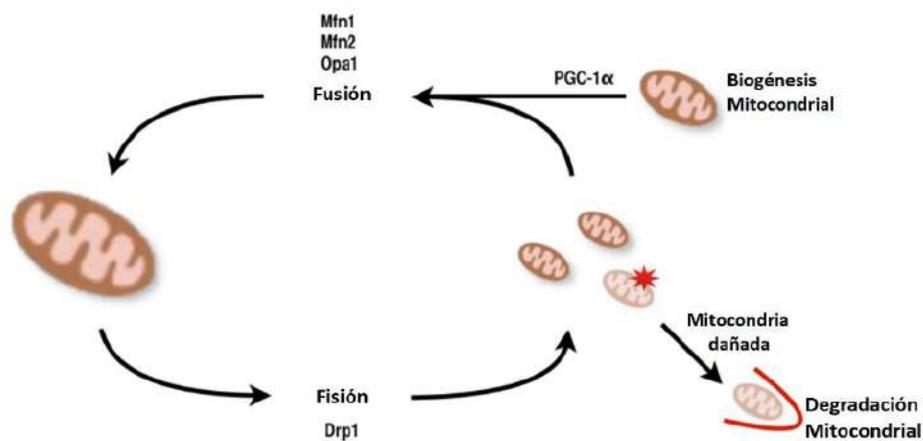


Figura 6. Esquema gráfico de los procesos de Dinámica mitocondrial y las principales proteínas involucradas

Los primeros eventos de fisión y fusión fueron descritos en levaduras donde se descubrió una amplia familia de GTPasas encargadas de mediar dichos procesos. **La fusión mitocondrial** es un proceso concertado que implica primero la fusión de las membranas externas y luego la fusión de las membranas internas. Fzo y Mgm1, descubiertas en levaduras, fueron las primeras proteínas descritas que median este proceso. Sus ortólogos altamente conservados en mamíferos son Mfn1/2 y OPA1 (optic atrophy 1) respectivamente. Mfn1 y 2 poseen dos segmentos transmembrana insertos en la membrana mitocondrial externa con su mayor parte en la cara citosólica y mediante la hidrólisis de GTP inducen un cambio conformacional de este dominio mediando la unión de las membranas (Rojo M., 2002). A su vez, la fusión de la membrana interna es mediada por OPA1, la cual posee una secuencia de importe N-terminal seguida de secuencias de clivaje que permiten generar las dos variantes que son necesarias durante el proceso de fusión. Seguido de las secuencias de clivaje se encuentra

el dominio GTPasa y por último el dominio GED (dominio efector- GTP) encargado de la interacción con Mfn1/2 que permite coordinar el proceso de fusión de la MIM y la MEM (Zorzano A., 2010).

En levaduras las principales proteínas involucradas en el proceso de **la fisión mitocondrial** son Dnm1 (proteína de tipo dinamina 1), Fis1 (proteína de fisión mitocondrial) y Mdv1 (proteína de división mitocondrial). En mamíferos encontramos a Drp1 ortólogo de Dnm1, que es una proteína citosólica capaz de formar oligómeros y consta de tres dominios, un dominio efector de GTP C-terminal unidos por un dominio α -hélice y el dominio GTPasa N-terminal. Drp1 presenta una variante de *splicing* especial en cerebro. Por otro lado, en mamíferos, también se encuentra Fis1, la cual está anclada a la membrana externa mitocondrial y es la principal encargada de reclutar a Drp1 (Mozdy A. D., 2000). No es la única sino que en mamíferos se han descrito otras proteínas como MFF (factor de fisión mitocondrial) y las Mid49/ 51 (proteína de dinamica mitocondrial de 49 y 51 Kda) que ejercen el papel de Fis1 (Otera H., 2010). El proceso de fisión ocurre cuando los oligómeros de Drp1 forman un espiral y se reclutan a la MEM produciendo una estrangulación de la organela dependiente de la hidrólisis de GTP (Figura 7).

Los ciclos de las mitocondrias comienzan con el crecimiento y la división de organelas pre-existentes (biogénesis) y finalizan con el recambio y la degradación de organelas deterioradas o sobrantes (mitofagia). Las redes mitocondriales fusionadas son importantes para la disipación de la energía metabólica a través de la transmisión del potencial de membrana mitocondrial a lo largo de filamentos, para la complementación de los productos génicos provenientes de ADN mitocondrial (ADNmt) en células heteroplásmicas (Yoneda M., 1992) y para contrarrestar la disminución de las funciones respiratorias durante el envejecimiento. Por otra parte, la fisión es requerida para la herencia y partición de los orgánulos durante la división celular, para la distribución intracelular a través del citoesqueleto y el recambio por mitofagia y para la liberación de factores pro-apoptóticos desde el espacio intermembrana (Lee Y. J., 2004).

Mediante la **biogénesis mitocondrial** las células aumentan su masa mitocondrial individual y el número de copias incrementando la producción de ATP en respuesta a una mayor demanda energética. Durante este proceso, aumenta la expresión de las enzimas metabólicas de la glucólisis, de la fosforilación oxidativa, lo que genera una mayor capacidad metabólica mitocondrial. Sin embargo, dependiendo de las señales extracelulares e

intracelulares se puede favorecer la biogénesis o la mitofagia, aumentando o disminuyendo el número y el tamaño de las mitocondrias (Bereiter-Hahn J. y Voth M., 1994; Rube D. A., y van der Blik A. M., 2004).

El factor de transcripción proliferador de peroxisoma activado por receptores gama coactivador 1-alfa (PGC-1 α) es el principal mediador del proceso de biogénesis mitocondrial. PGC-1 α , miembro de la familia de receptores nucleares, luego de su activación induce la expresión de proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial y de factores de transcripción, como por ejemplo, el receptor gama activador del factor proliferador de peroxisoma (PPAR- γ), con el que interacciona permitiendo la activación de factores de transcripción como NRF-1 y NRF-2 (factores respiratorios nucleares 1 y 2). Estos últimos promueven la expresión de Tfam (Factor de transcripción mitocondrial A) que induce la síntesis de ADNmt y enzimas mitocondriales (Figura 8).

Se ha descrito que la capacidad de biogénesis mitocondrial disminuye con la edad, y dicha función mitocondrial disminuida se ha asociado con la pérdida de masa muscular, la diabetes y enfermedades neurodegenerativas. El envejecimiento también puede inducir cambios en los niveles de expresión de proteínas involucradas en la dinámica y biogénesis mitocondrial, afectando la homeostasis mitocondrial.

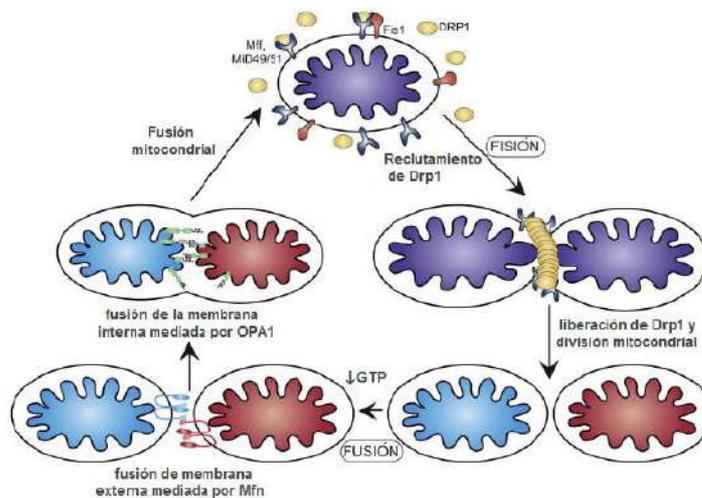


Figura 7. Esquema que resume el ciclo de fisión y fusión mitocondrial con sus principales componentes (en mamíferos).

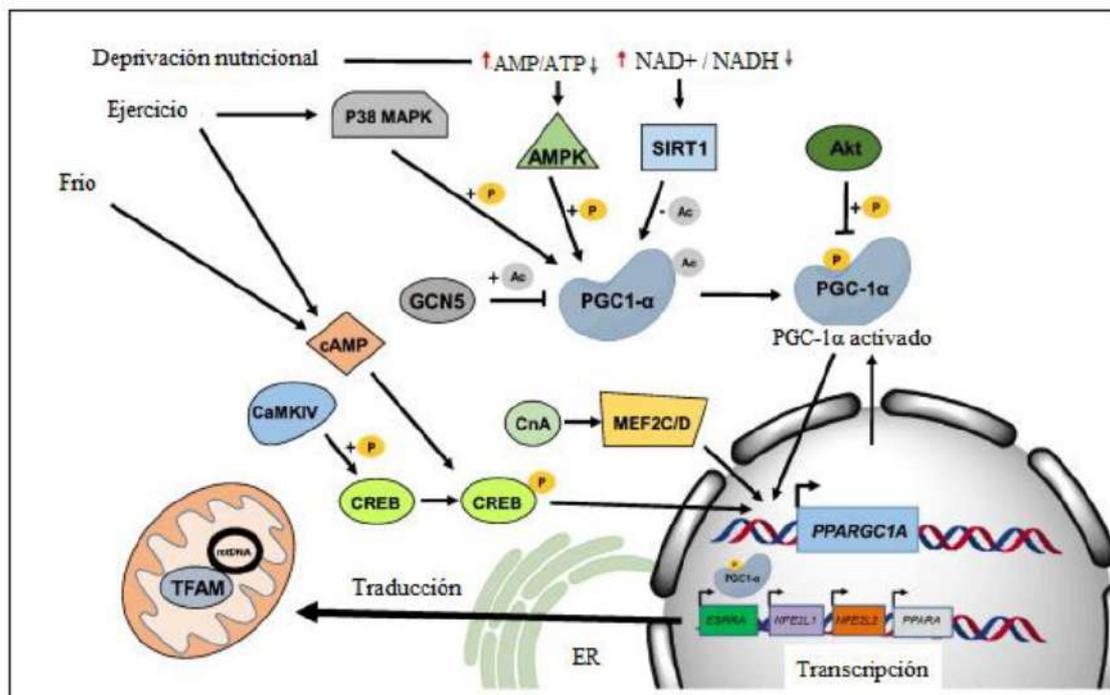


Figura 8. Representación gráfica del proceso de biogénesis mitocondrial

3.3 EL ÓXIDO NÍTRICO

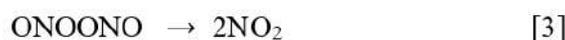
El óxido nítrico (NO) es una molécula diatómica sin carga que en condiciones normales de presión y temperatura es un gas incoloro relativamente lipofílico (6-8 veces más soluble que en agua), por lo cual sus reacciones se ven favorecidas en membranas biológicas con respecto a ambientes acuosos, aunque su solubilidad en agua es similar a la del O_2 (2 mM). (Shaw A., 1977). El NO es un radical libre con un electrón desapareado compartido entre el nitrógeno y el oxígeno, con predominancia sobre el nitrógeno, por lo que reacciona con otras moléculas a través de este último (Fukuto J. M., 2000).

El NO puede ser reducido u oxidado en sistemas biológicos, originando una familia de especies secundarias. Su reactividad intermedia le confiere alta selectividad en sus reacciones que lo convierten en un segundo mensajero ideal (Lowenstein C. J., 1994; Pacher P., 2007). Su amplio rango de funciones fisiológicas incluye desde la protección contra patógenos, la tonicidad vascular, la proliferación, la muerte celular y la acción como neurotransmisor hasta la oxidación y nitración de proteínas.

Los efectos del NO sobre el metabolismo y la señalización mitocondrial son ampliamente estudiados. El NO regula el consumo de oxígeno mitocondrial por inhibición reversible de la citocromo oxidasa, modifica el potencial de membrana y se ve involucrado en la homeostasis del calcio (Sisalli M. J., 2014).

A bajas concentraciones (< 200nM), el NO interactúa principalmente de forma directa con sus blancos biológicos. A concentraciones que varían entre 0,05-0,10 μM compite en forma reversible con dos sitios de unión del oxígeno de la citocromo oxidasa en la ETC (Takehara Y., 1995). A concentraciones mayores, 0,3-0,5 μM, NO impide la transferencia de electrones entre los citocromos *b* y *c1* presentes en el CIII (Carreras M. C., 2007; Sampath P. D., 2009). La inhibición de estos complejos genera un estado altamente reducido de los componentes de la ETC que promueve la oxidación de las moléculas de ubiquinol y como producto final ubiquinona y O₂⁻ (Poderoso J. J., 1999). Además, interactúa de forma directa sobre el cGMP, y a través de las nitrosilaciones que sufren algunas proteínas son capaces de regular su actividad (Haun F., 2013; Zhang, Y. H., 2014; Russwurm M., 2013).

A concentraciones elevadas (>400nM), se favorece la interacción de forma indirecta del NO a través de las especies reactivas del nitrógeno (RNS) producidas por su reacción con especies reactivas del oxígeno, las cuales incluyen al oxígeno y sus productos de reducción parcial (Radi R., 2002; Pacher P., 2007). El O₂ reacciona con dos moléculas de NO, generando dos moléculas de dióxido de nitrógeno (NO₂), a través de las reacciones [1-3].



El NO₂ es otro radical, mucho más oxidante que el NO (E = +1.04 V para la cupla NO₂/NO₂⁻) (Stanbury D. M., 1989). La reacción del NO₂ con NO en soluciones acuosas genera nitrito como producto estable (reacciones [4- 5]).



La reacción [5] es una nitrosación del agua (adición de NO^+). La nitrosación es una reacción muy favorable del N_2O_3 , que ocurre con nucleófilos en general, como por ejemplo los tioles (Challis B. C., 1978).

A su vez, la reacción del anión superóxido (O_2^-) con NO es muy favorable (Blough N. V., 1985) y se ve limitada solo por la difusión de las especies (Huie R. E., 1993) (reacciones [6-7]).



La protonación del peroxinitrito (ONOO^-) es seguida por la rápida lisis del ácido, que genera dos radicales de vida media muy corta, el NO_2^\bullet y el OH^\bullet . Estos radicales son responsables de gran parte del espectro de las reacciones del ONOO^- , en su mayoría de oxidación, con constituyentes biológicos (Pryor W. A., 1999). Su concentración está limitada por la presencia de superóxido dismutasa (SOD), la cual compite por el O_2^- ; dado que la concentración de SOD es un orden mayor, en condiciones normales, la producción de ONOO^- es baja. La altísima reactividad del ONOO^- se ve limitada en parte por su corta vida media (0,67 seg) que asegura una baja difusión (Denicola A., 1998). Esta particularidad determina que el ONOO^- actúe solamente en el sitio donde es formado.

Tanto el NO_2^\bullet como el ONOO^- son capaces de oxidar moléculas blanco como tioles o grupos metálicos, pero la nitración de residuos de tirosina en proteínas es la modificación postraduccional más significativa. La nitración (N-Tyr) puede generar cambios conformacionales que modifican la actividad enzimática o impiden la unión de sustratos y moléculas blanco (Zou M., 1997; Ara J., 1998; Sousa J. M., 2008; Deeb R. S., 2006).

El CI de la ETC es muy susceptible a RNS; niveles fisiológicos de NO generan inhibición reversible por S-nitrosación de un tiol (Chinta S. J., 2006) pero cuando los niveles superan $10 \mu\text{M}$, el ONOO^- generado actúa modificando residuos de tirosina en subunidades del complejo I, limitando así la entrada de electrones a la cadena de transporte (Davis C.W., 2010). Otro blanco del ONOO^- es el citocromo *c*, este posee cuatro tirosinas capaces de ser nitradas generando cambios conformacionales que conducen a la pérdida de la capacidad para transportar electrones (Jang B. y Han S., 2006). La inhibición de la ETC por las reacciones directas e indirectas del NO favorece la formación de ROS tales como O_2^- y H_2O_2 dentro de la

mitocondria (Poderoso J. J., 1996). Además de actuar sobre la ETC, el NO afecta otras proteínas mitocondriales, sus derivados como el peroxinitrito pueden desencadenar falla en la degradación proteosómica, inhibición de la actividad enzimática e interferencia en funciones de regulación, lo que puede traducirse en enfermedades ligadas al envejecimiento por alteración estructural de proteínas (Perez-Gallardo R. V., 2014).

3.3.1 Las óxido nítrico sintasas

Hasta ahora hemos descrito los efectos del NO en la homeostasis celular y más precisamente sobre la mitocondria, pero para comprender su mecanismo de acción es necesario estudiar de dónde viene y cómo se genera. El NO es producido en las células por enzimas oxido-reductasas conocidas como óxido nítrico sintasas (NOS), que a través de la oxidación de cinco electrones del centro guanidínico del aminoácido L-arginina (L-Arg) utilizando NADPH como dador de electrones, obtienen cantidades equimolares de NO, el aminoácido citrulina y agua (Förstermann U. y Sessa W. C., 2011) (Figura 9).

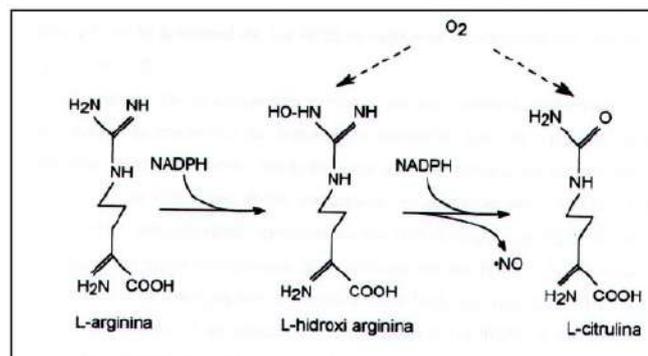


Figura 9. Reacción de síntesis de NO a partir de L-Arginina

Las NOS poseen dos dominios principales, un dominio oxidasa N-terminal y un dominio reductasa C-terminal unidos por una región bisagra de unión a calcio-calmodulina (Ca-CAM). El dominio oxidasa N-terminal contiene sitios de unión a hemo, a tetrahidrobiopterina (BH₄) y a su sustrato, arginina. El dominio reductasa, a su vez, posee subdominios con unión al cofactor flavina adenina mononucleótido (FMN), a NADPH y a flavina adenina dinucleótido (FAD). Este último dominio pertenece a una gran familia de proteínas que incluyen a la citocromo P450 reductasa dependiente de NADPH (CYPOR), las flavoproteínas sulfito reductasas y la reductasa 1 (Gruez A., 2000; Wang M., 1997; Paine M. J., 2000).

Ambos dominios son catalíticamente activos por separado (Ghosh D. K, 1995); sin embargo, no es posible la catálisis de NO a menos que ambos dominios estén interconectados y la enzima se encuentre como homodímero a través de la interacción de los dominios oxigenasa de cada monómero (Crane B.R, 1998; Fischmann T. O., 1999). El pasaje de electrones ocurre de manera cruzada entre el dominio reductasa de uno de los monómeros y el grupo hemo unido al dominio oxigenasa del otro. Algunos trabajos sugieren que en el dominio reductasa los sub-dominios FMN de los dímeros de NOS oscilan cediendo y aceptando electrones en una configuración que mantiene unida y activa a la proteína. A su vez hay una unión covalente hemo-FMN y una interacción no-covalente entre este complejo y CaM (hemo-FMN:CaM). En este contexto, la fosforilación inhibitoria en el sitio Ca-CAM (ser¹⁴¹²) bloquea el movimiento de los dominios FMN y el paso de electrones (Smith B.C., 2013; Garcin E. D., 2004; Förstermann U., 2011) (Figura 10).

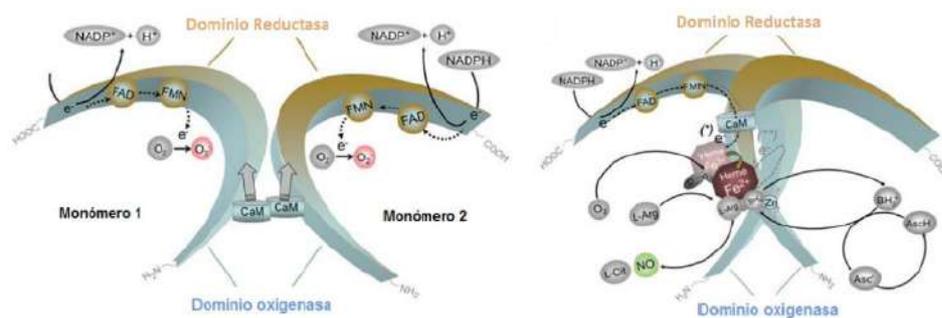


Figura 10. Estructura y modelo catalítico de NOS

3.3.2 Isoformas de NOS

En mamíferos existen tres isoformas codificadas en diferentes genes, que cumplen funciones variadas y responden de manera diferente a los inhibidores. Actualmente se las conoce como NOS neuronal (nNOS o NOS-1, 161KDa), NOS inducible (iNOS o NOS-2, 133KDa) y NOS endotelial (eNOS o NOS-3, 131KDa). Tanto la nNOS como la eNOS son de expresión constitutiva y calcio dependiente para su actividad. La nNOS fue la primera de las tres isoformas en ser identificada y descrita en tejido nervioso y contiene un dominio PDZ que contribuye a su anclaje e interacción con otras proteínas. La eNOS fue originalmente descrita en las células del endotelio vascular y tiene un rol crucial en la regulación del tono vascular, la proliferación celular, la adhesión de los leucocitos y la agregación plaquetaria (Wang Y., 1995). Por último, la iNOS se expresa de manera inducible en una variedad de tejidos y fue originalmente descrita en macrófagos, su expresión está regulada por citoquinas

proinflamatorias, lipopolisacárido bacterial, etc. (Geller D. A., Sherman M. P., 1993). Dada su alta afinidad por el Ca, se considera Ca independiente para su actividad (Figura 11).

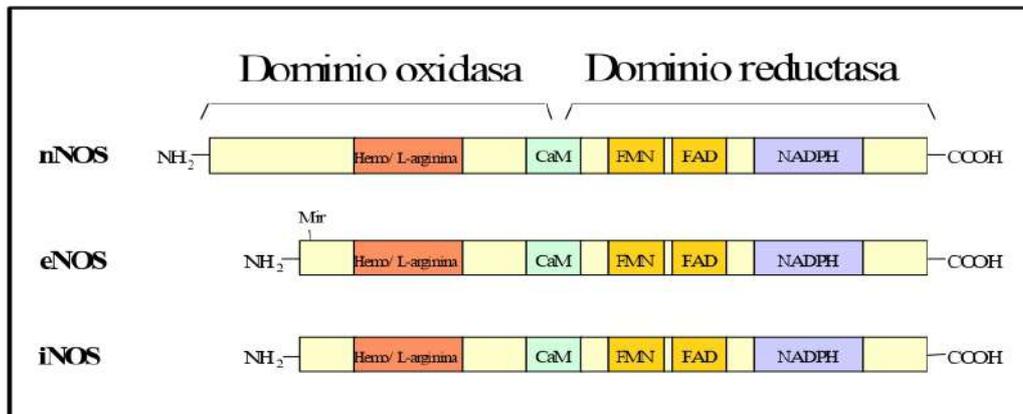


Figura 11. Isoformas clásicas de la NOS

NOS neuronal (nNOS)

El gen que codifica para la isoforma neuronal de NOS es uno de los más complejos del genoma (Brennan J. E., 1997). Debido a la presencia de múltiples promotores y sitios de inicio de la transcripción, existen numerosas variantes de *splicing*, donde la inclusión o exclusión de dominio PDZ del extremo terminal de la nNOS es de las más descritas en la literatura. Este dominio PDZ de interacción proteína-proteína de aproximadamente 100 aminoácidos no parece ser relevante para la actividad enzimática (Panda K., 2003) pero puede interactuar con dominios PDZ de otras proteínas o con secuencias consenso en los extremos carboxilo terminales de proteínas blanco (Kang B. S., 2003; Nourry C., 2003). De esta manera, nNOS forma complejos que determinan su ubicación subcelular, como en el caso de su interacción con la proteína de densidad postsináptica 95 (PSD-95) que actúa como proteína de anclaje en neuronas (Kim E., 2004).

Diferentes trabajos han demostrado un aumento considerable de nNOS en el cerebro de rata durante el envejecimiento con aumento de nitrosilación de proteínas mitocondriales (Lam P. Y., 2009). Aunque la actividad de nNOS puede hallarse disminuida en regiones cerebrales específicas (Navarro A., 2008), nuestro grupo ha observado, en resultados preliminares, un aumento en la expresión y actividad de nNOS seguido de un aumento en los niveles de nitración de proteínas mitocondriales en cerebro e hígado de ratas a lo largo del envejecimiento.

Debido al papel fundamental del NO en varios procesos patológicos, se ha desarrollado una amplia gama de inhibidores químicos para su estudio, que pueden clasificarse de acuerdo a su sitio de unión.

1. Inhibidores que actúan sobre el sitio de unión a Arg.
2. Compuestos que mimetizan el co-factor BH₄.
3. Inhibidores que interactúan con el grupo hemo de las NOS, estos compuestos se unen a la enzima en forma monomérica e impiden la dimerización.
4. Compuestos que interactúan con los cofactores calmodulina o flavinas.

Los inhibidores análogos de L-Arg representan el grupo que se descubrió primero y actualmente, el más utilizado. Dentro de este grupo se encuentra el compuesto L-N^ω-Nitro-Arginina Metil Éster (L-NAME), que actúa a través de una unión no-covalente con las NOS una vez que es hidrolizado a L-N^ω-Nitroarginina (L-NNA) un inhibidor más potente pero menos soluble.

3.4 p66^{SHC} Y LA FAMILIA DE PROTEÍNAS SHC

Dada la amplia evidencia científica que señala a la mitocondria como regulador clave de la longevidad, se han destinado recursos y esfuerzos a la identificación de los mecanismos responsables de los efectos nocivos de la producción de ROS mitocondrial en el proceso de envejecimiento y en las vías moleculares responsables de su generación.

Se han identificado en mamíferos, *Drosophila* y *C. elegans* tres isoformas del protooncogen SHC1, las proteínas shc de 46, 52 y 66 kDa (p46shc, p52shc, p66shc) sugiriendo un papel conservado evolutivamente del locus (Luzi L., 2000; Pelicci G., 1996). Todas las isoformas de SHC1 se generan a partir del mismo ARNm mediante *splicing* alternativo y su delección total resulta letal (Pelicci G., 1992). Estas proteínas controlan una amplia variedad de funciones celulares críticas, como el crecimiento (Migliaccio E., 1997; Ravichandran K. S., 2001), la apoptosis (Pacini S., 2004; Trinei M., 2002; Giorgio M., 2005; Pinton P., 2007; Orsini F., 2004) y la esperanza de vida a través de la transmisión de información de los receptores de superficie como EGFR, erbV-2 e insulina (Migliaccio E., 1999). Estas proteínas se definen como “adaptadoras” ya que se unen a las tirosinas fosforiladas de los receptores de factores de crecimiento a través de sus dominios PTB y SH2 (Pelicci G., 1992). Las tres comparten los

dominios PTB / SH2 y CH1, pero p66shc, con rol mitocondrial, se caracteriza por una región CH adicional (CH2) localizada en el extremo N terminal que puede ser fosforilada en serina 36 (Migliaccio E., 1997; Pelicci G., 1992).

Mientras que p46shc y p52shc ejercen su acción a través de la vía de señalización ERK/RAS, p66^{shc}, la isoforma más larga de este locus, es un determinante genético de longevidad que regula el metabolismo mitocondrial a través de la generación de ROS mediando la apoptosis celular. Consecuentemente, la ablación de p66^{shc} se traduce en una marcada disminución de la producción de ROS mitocondrial y en un 30% de aumento de la expectativa de vida de los animales de experimentación siendo más resistentes al estrés oxidativo (Nemoto et al, 1996). Además, estos ratones están protegidos contra la disfunción endotelial mediada por ROS asociada a la edad y contra el envejecimiento de las células madre cardíacas (Francia P. 2004; Rota M. 2006).

3.4.1 Mecanismo de acción de p66shc en la mitocondria

Ante una señal de estrés (factor de crecimiento, activación de receptor de insulina, excesiva radiación o estrés oxidativo), PKC β se activa y fosforila en Ser36 a p66shc en el citoplasma. Esto permite el reconocimiento y la unión de la protil isomerasa Pin1 isomerizando de cis a trans a p66shc. Luego, esta última es desfosforilada por PPA2 (pirofosfatasa 2) e importada mediante los complejos TIM/TOM y mtHSP70 a la mitocondria donde causa alteraciones de las respuestas mitocondriales de calcio, se une al citocromo *c* y actúa como una oxidoreductasa, transportando electrones del citocromo *c* al oxígeno molecular. p66shc induce la producción de ROS, la fragmentación de mitocondrias, la liberación de citocromo *c* y la apoptosis (Gioglio M., 2005) (Figura 12).

La existencia de esta reacción redox alternativa, evitando la cadena de transferencia de electrones mitocondrial y generando ROS mitocondrial en respuesta a señales de estrés específicas, respalda el papel de estas especies de oxígeno como potentes moléculas de señalización y a la vía de señalización p66shc como un determinante clave del metabolismo energético. Esta hipótesis se ve reforzada por el reciente descubrimiento de que las ROS producidas por la inducción de p66shc regulan la señalización de la insulina en los adipocitos y el desarrollo de grasa. La insulina induce la actividad redox de p66shc, afectando la cascada de señalización de insulina a favor de una reducción del consumo de oxígeno mitocondrial y una inducción del desarrollo de grasa. Además, se informó que los animales *knock-out* p66shc

poseen alteraciones de la regulación térmica causada por una reducción de la masa grasa de los tejidos adiposos blanco y marrón, independiente de la ingesta de alimentos, la absorción intestinal de nutrientes o actividades locomotoras (Berniankovich I., 2008). Por lo tanto, la adaptación al frío así como la optimización del almacenamiento de energía podrían ser funciones evolutivas conservadas que conservan el gen *p66shc* en mamíferos. Estos hallazgos sugieren la existencia de un vínculo estrecho entre el metabolismo energético, el estrés oxidativo y el envejecimiento, según la teoría mitocondrial del envejecimiento por ROS.

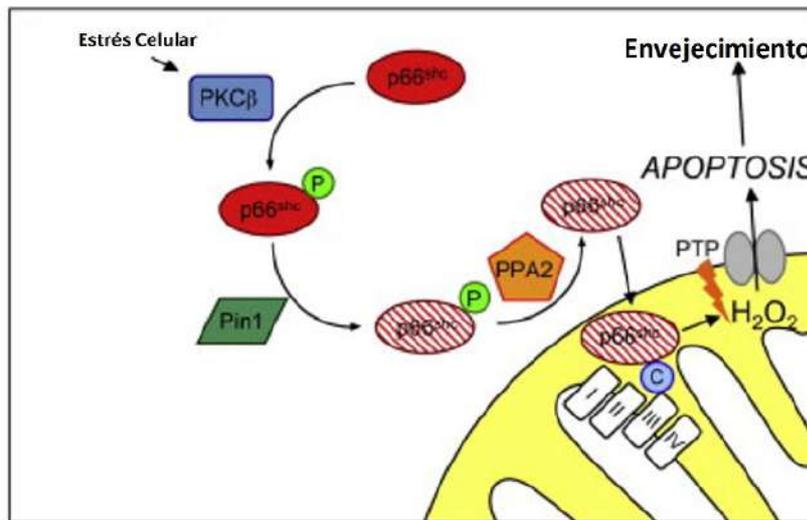


Figura 12. Mecanismo de acción y señalización de *p66shc*

3.5 SIRT3, UNA SIRTUINA MITOCONDRIAL

Las sirtuinas son una familia de desacetilasas dependientes de NAD^+ , conservadas a lo largo de la evolución y capaces de retrasar el proceso de envejecimiento. En mamíferos existen 7 sirtuinas ortólogas a *sir2* presente en levaduras, siendo Sirt1 de sublocalización nuclear, la estructuralmente más parecida. Se ha descrito que Sirt1 es capaz de actuar como represor transcripcional desacetilando histonas así como también regulando la acetilación de factores de transcripción como MyoD, FOXO, p53 y NF- κ B (Vaziri H., 2001; Yeung F., 2004). Otras sirtuinas nucleares menos estudiadas son Sirt6 y Sirt7 que fueron asociadas a la histona H3K9 en la regulación de telómeros y como regulador de la ARN polimerasa I respectivamente (Michishita E., 2008; Ford E., 2006). Sirt2, de sublocalización citoplasmática, es asociada a la deacetilación de microtúbulos y α -tubulina. (North B. J., 2003). Por último, Sirt3, Sirt4 y Sirt5 están localizadas en mitocondrias, siendo la primera la más estudiada y asociada a regulación de vías metabólicas.

Los cambios en el perfil de acetilación de las lisinas en las proteínas o “acetiloma” están asociados con el envejecimiento y enfermedades relacionadas con este proceso ya que distintos factores, como las histonas deacetilasas I y II (HDACs), las sirtuinas y las histonas acetil-transferasas (HATs), median el detrimento de diversas funciones biológicas dependientes de la edad, incluyendo el deterioro cognitivo, el cáncer y la neurodegeneración (Puri P.L., y Sartorelli V, 2010). Dentro de las sirtuinas de sublocalización mitocondrial se encuentra Sirt3, que regula la acetilación de muchas de las proteínas que participan en la generación de ATP, el ciclo de la urea, el metabolismo de lípidos, el ciclo de los ácidos tricarbónicos, la cadena de transporte de electrones, la regulación redox y la respuesta al estrés (Lombard D. B., 2007; Schwer B., 2006; Hallows W. C., 2006).

Estudios recientes demostraron que durante el ayuno o la restricción calórica se modulan los niveles de acetilación de proteínas mitocondriales en ratones (Schwer., 2009). Además, se ha descrito un aumento de la expresión de Sirt3 en varios tejidos bajo esta condición, lo que sugiere que esta sirtuina podría mediar la protección de estos tejidos contra el envejecimiento inducido por ROS (Hallows W. C., 2011, Perez., 2009; Shi., 2005). En consecuencia, sería posible que la activación de Sirt3 sea regulada por los niveles de ROS/RNS coordinando el proceso de envejecimiento. El NO promueve un aumento de la producción mitocondrial de O_2^- por diferentes mecanismos, pero podría como potencial activador de p66^{shc} ser un factor significativo y contribuyente a esta producción modulando la homeostasis mitocondrial.

4 HIPÓTESIS

Durante el envejecimiento, las especies reactivas del oxígeno/nitrogeno podrían modular la expresión y actividad de proteínas mitocondriales clave para el mantenimiento de la homeostasis celular como la desacetilasa Sirt3, coordinando la biogénesis mitocondrial y el balance entre fusión/fisión de dichas organelas en el cerebro de ratones p66^{shc^{-/-}}.

5 OBJETIVOS

Objetivo general

Profundizar en la relación bidireccional entre la homeostasis redox y los genes reguladores de la senescencia en un modelo de envejecimiento saludable, analizando cómo los cambios en el metabolismo oxidativo/nitrosativo de los ratones p66^{shc^{-/-}} influyen en el equilibrio de la dinámica mitocondrial y en la actividad de Sirt3.

Objetivos específicos:

- 1) Determinar si existen cambios en los niveles de NO en los ratones p66^{shc^{-/-}} que modifiquen el metabolismo mitocondrial.
- 2) Establecer que las alteraciones metabólicas en los ratones p66^{shc^{-/-}} se correlacionan a cambios en el contenido y la dinámica mitocondrial y en la estructura de la red de las mismas.
- 3) Estudiar cómo se asocia el envejecimiento a cambios en Sirt3 a través del NO y ROS.
- 4) Explorar los posibles mecanismos por los cuales p66shc, Sirt3 y el NO coordinarían procesos para dar lugar a una mayor esperanza de vida.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Colonia de ratones y Bioética

El Dr. P.G. Pellicci del Instituto Europeo de Oncología de Milán amablemente proporcionó las parejas reproductoras de ratones 129/SV p66shc *knock-out* (p66^{shc(-/-)}) para este proyecto. Las poblaciones reproductoras se retrocruzaron con ratones 129/SV de genotipo salvaje. La colonia se mantuvo en las instalaciones del bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

Ratones heterocigotas para el gen mutante (p66^{shc(+/-)}) fueron apareados entre si para producir el ratón mutante homocigota (p66^{shc(-/-)}), y el ratón de genotipo salvaje (WT) utilizado como control para el estudio. El proceso de envejecimiento de los ratones fue llevado a cabo íntegramente en las instalaciones del Bioterio en donde fueron alojados durante toda su vida a temperaturas constantes (20-24 °C) con un ciclo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad y alimentados ad libitum con una dieta estándar de libre acceso al agua. Los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con los principios de cuidado y de animales de laboratorio para investigación. El Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Universidad de Buenos Aires aprobó todos los procedimientos realizados en estos animales. Se hicieron todos los esfuerzos posibles para minimizar y reducir el número de animales utilizados y el sufrimiento de los mismos. Para el mantenimiento de la colonia de ratones *knock-out* fue necesario que al momento del destete se obtenga un trozo de tejido (oreja/cola) para extraer ADN_g y realizar PCR a punto final con primers específicos para determinar el genotipo de los ratones.

En la Tabla 1 se resumen los anticuerpos primarios utilizados en la presente tesis, con las diluciones y pesos moleculares correspondientes.

Para la detección de las proteínas a través de SDS-PAGE y Western Blot se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) de Amersham (GE Healthcare) o con fluoróforos Alexa Fluor 488 cabra anti-ratón y Alexa Fluor 555 cabra anti-conejo que fueron adquiridos en Li-Cor (Argentina).

Tabla 1. Diluciones utilizadas de cada anticuerpo de interés y de los correspondientes anticuerpos secundarios.

Anticuerpo	Marca	Peso	Dilución	Dilución	Tipo de Ab
		Molecular (KDa)	Ab 1º	Ab 2º	secundario
NOS1	BD (aa 1095 a 1289)	155	1:1000	1:20000	Anti-ratón
NOS1	Santa Cruz (R20)	155	1:500	1:20000	Anti-conejo
β-actina	Santa Cruz (I-19)	42	1:2000	1:6000	Anti-cabra
Opa 1	BD (612607)	80	1:2000	1:8000	Anti-ratón
Mfn2	Santa Cruz (H68)	72	1:1000	1:5000	Anti-conejo
Dnml1	BD (611113)	80	1:2000	1:6000	Anti-ratón
P-DRP1	Santa Cruz (Ser616)	44-42	1:1000	1:5000	Anti-conejo
Nitrotirosina	EMD Millipore		1:1000	1:10000	Anti-raton
SOD2	Cell Signaling	22	1:1000	1:20000	Anti-conejo
Sirt3	Cell Signaling	28	1:1000	1:5000	Anti-conejo
VDAC	Santa Cruz (N-18)	35	1:2000	1:8000	Anti-cabra

6.2 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos que se detallan en la Tabla 3 fueron diseñados con el programa Pri-Fi para ADNc con homología en rata, ratón y humano de acuerdo con los criterios básicos de %CG y sintetizados, al igual que los oligo (dT), por Genbiotech e Invitrogen (Argentina). Los tamaños de los productos se corroboraron por corrida en un gel de agarosa 2%.

Tabla 2. Secuencia de primers para amplificar ADNg/ADNc/ADNm por qPCR.

Nombre del Gen	Primer sentido (5' a 3')	Primer antisentido (5' a 3')	Pares de base (pb)
GAPDH	CTGCACCACCAACTGCTTAG	AGGGGCCATCCACAGTCTTC	122
Mfn2	CTGGTGGCCAACTCAGAGTCCA	GCCGCACCTCCTCCATGTACTC	151
Drp-1	TGGAACAAAGTATCTTGCTAGG	GAAGAGACTGATACTGAGCAGC	116
Opa 1	CTGGAAGAATCGGACCCAAG	AGGTTCTTCCGGACTGTGGT	132
PGC1-α	AGCTCCAAGACCAGGAAATCCG	AGGCCATCCATGGCTAGTCCTG	175
SOD2	GTAGGGCCTGTCCGATGATG	CGCTACTGAGAAAGGTGCCA	130
CAT	CACTGACGAGATGGCACACT	TGTGGAGAATCGAACGGCAA	175
NOS1	ATGTCCTCAAAGCCATCCAGCG	GGACTCAGATCTAAGGCGGTGG	167
12S ARNr	ACCGCGGTCATACGATTAAC	CCCAGTTGGGTCTTAGCTG	178
16S ARNr	ACCCCGCCTGTTACCAAAA	ATGCTACCTTGCACGGTCA	113
p66^{shc(-/-)}	CTCGTGTGGGCTTATTGACAAAG	GGGTGGAGAGGCTTTTTGCTTC	550
p66^{shc(+/+)}	CTCGTGTGGGCTTATTGACAAAG	CCTCCCCAGGTCATCTGTTATCAC	330

6.3 Obtención de homogenatos, citosol y mitocondrias purificadas

Luego de sacrificados los animales, se procedió a la extracción del cerebro y se los colocó inmediatamente en 40 ml de *buffer* MSHE a 4 °C (0,23 M manitol, 70 mM sacarosa, 1 mM EGTA, 25 mM HEPES, pH 7,4) suplementado con antiproteasas (5 µg/ml de aprotinina, 5 µg/ml de leupeptina y 10 µg/ml pepstatina). A partir de aquí, todo el procedimiento se realizó en baño de hielo. Los cerebros fueron reducidos a pequeños trozos con tijera y homogeneizados en *potter* Evelheim, previo agregado de 100 µg/ml de PMSF. En esta etapa se tomaron muestras de cada grupo para constituir los *homogenatos* que se utilizaron para los lisados totales.

Se descartó el precipitado correspondiente al tejido no disgregado, células enteras y núcleos por centrifugación a 700 x g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue centrifugado a 10.000 x g durante 10 min a 4 °C para precipitar las mitocondrias. El precipitado resultante de la centrifugación a 10.000 x g fue resuspendido en 2 ml de *buffer* MSHE con 0,1% seroalbúmina bovina (BSA) y 8 ml de *buffer* Percoll (30% Percoll, 0,23 M manitol, 0,07 M sacarosa, 0,5 mM EGTA, 2 mM HEPES, pH 7,4) y ultracentrifugado a 100.000 x g durante 30 min a 4 °C. Se recolectó la banda marrón más densa correspondiente a *la fracción mitocondrial* y se procedió a dos lavados con *buffer* MSHE con 0,1 % BSA, un lavado con 150 mM KCl para extraer la arginasa presente en la cara citosólica de la membrana externa mitocondrial, y dos lavados con *buffer* MSHE. El precipitado se resuspendió en 2 ml de *buffer* MSHE con antiproteasas, y corresponde a la fracción *mitocondrias purificadas* (Tatoyan y Giulivi, 1998).

El siguiente esquema resume los procedimientos descriptos:

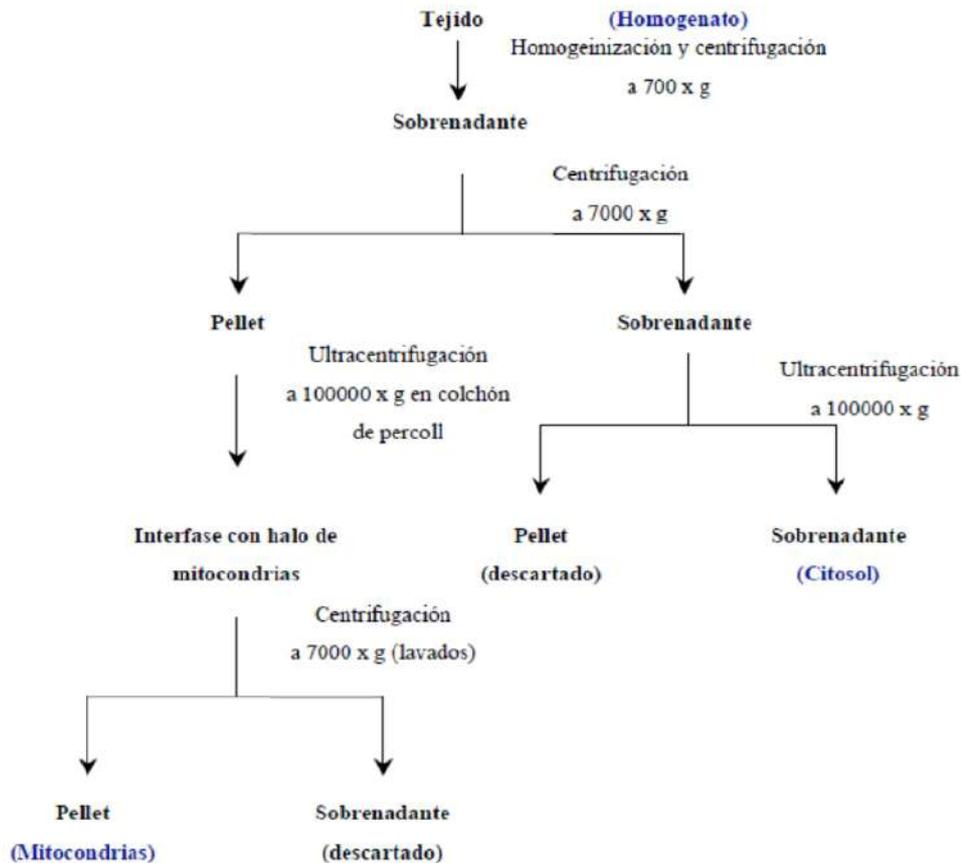


Figura 13. Esquema de la purificación de las distintas fracciones celulares

6.4 Cuantificación de proteínas por el Método de Bradford.

Este método se utilizó para medir muestras con una masa de proteínas dentro del rango de 0,1 a 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

6.4.1 Preparación del reactivo

Se diluyó el reactivo comercial en la proporción 1:5, luego se filtró y se guardó en frasco color caramelo a 4°C hasta su uso. La técnica se desarrolló en microplaca de 96 pocillos con base plana.

6.4.2 Curva de calibración

Se utilizó una solución madre de 2 µg/µl BSA y la curva de calibración se realizó con las siguientes concentraciones de BSA: 2 - 1 - 0,5 - 0,25 - 0,125 µg/µl. Se graficó la absorbancia en función de las concentraciones, para obtener la ecuación de la función.

6.4.3 Ensayo de muestras, controles y *pool*es

Se realizó por duplicado cada determinación. 5 µl de muestra se colocaron en cada pocillo, luego se agregaron 20 µl de agua destilada y 200 µl del reactivo de Bradford. Se incubó durante 10 minutos. Luego se leyó la absorbancia a 595 nm y se calculó la concentración de proteínas interpolando en la curva de calibración.

6.5 SDS-PAGE y Western Blot para detección de proteínas

6.5.1 Preparación de las muestras

Las proteínas aisladas de los lisados celulares fueron diluidas a la concentración deseada con *buffer* de siembra en un volumen final de 50 µl (Tris-HCl 10 mM, pH=8; SDS 1%; Glicerol 4%; sacarosa 0,146 M y azul de bromofenol; DTT 10 mM o β-mercaptoetanol 1%). Luego, las muestras se calentaron durante 5 min a 100°C.

6.5.2 Electroforesis

Se sembraron 30 µg de las muestras ya preparadas de cada una por pocillo. Adicionalmente, se sembró en otro pocillo el marcador de peso molecular Protein Page Ruler Marker (Fermentas). Se utilizó el sistema vertical de Bio-Rad. Las muestras se resolvieron en un gel de poliacrilamida de entre 7 a 15% en condiciones desnaturizantes a 15 mA por gel durante 40 minutos en presencia de *buffer* de electroforesis 1X (25 mM Tris; 192 mM Glicina; SDS 0,1%).

6.5.3 Transferencia a membrana de PVDF

Una vez concluida la separación electroforética, las proteínas fueron transferidas a un soporte sólido, en este caso un filtro de PVDF 0.4 (Hybond, Amersham Pharmacia). Una de las caras del gel fue apoyada sobre una membrana del mismo tamaño y ambos fueron colocados entre papeles Whatman 3M previamente humedecidos en *buffer* de transferencia (Towbin) 1X (Tris base 25 mM; glicina 192 mM; SDS 3,5 mM; pH=8,3 y metanol 20% (v/v)) y éstos, a su vez, colocados entre dos esponjas de poro grande y dentro de un soporte plástico. Toda la construcción fue sumergida en la cuba electroforética, con *buffer* de transferencia 1X, con la

membrana del lado anódico. La transferencia se llevó a cabo a 100 Volts, durante 90 min. Se verificó que la transferencia fuese exitosa tiñendo las membranas con rojo Ponceau (0,1% Rojo Ponceau, 5% ácido acético). La decoloración de la membrana se llevó a cabo lavando varias veces con *buffer* TBS-T (NaCl 150 mM; KCl 2,68 mM; Tris base 24,7 mM; Tween-20 0,05% (v/v); pH=7,4).

6.5.4 Immunodetección de proteínas

Para realizar la detección de las proteínas, en primer lugar se bloquearon las proteínas inespecíficas con TBS-T (Tween-20 0,05% (v/v) en 10 mM Tris-HCl; pH=7,4) con 5% (p/v) de leche en polvo durante 60 min. Luego, se lavaron las membranas con TBS-T y se incubaron durante toda la noche a 4°C, con agitación suave, con los diferentes anticuerpos primarios diluidos en una solución de 5% de BSA en TBS-T. Después de realizar 3 lavados de 15 min con TBS-T con agitación suave, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios, según el anticuerpo primario utilizado, acoplados a peroxidasa de rábano (HRP) o a un fluoróforo y diluidos en TBS-T, durante 2 h, a 4°C, con agitación suave. Luego, las membranas se lavaron con TBS-T. Para visualizar las proteínas por exposición en placas fotográficas se utilizó el kit de detección ECL (PBL, Quilmes Argentina), basado en la producción de quimioluminiscencia como consecuencia de la digestión de un sustrato de la enzima HRP o con un detector de fluorescencia Li-COR. Las bandas se cuantificaron densitométricamente utilizando los programas TotalLab e IMAGE STUDIO VER 5.2.5 y los resultados se normalizaron con actina β en caso de homogenatos o VDAC en caso de fracciones mitocondrial.

6.5.5 Immunoprecipitación de proteínas.

Las fracción mitocondrial (500 μ g de proteína) se inmunoprecipitó en *buffer* de lisis (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 % glicerol, 0,5% Nonidet P-40, 1 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 5 μ g/ mL leupeptina, 5 μ g/ mL pepstatina, 5 μ g/ mL aprotinina, 25 mM NaF y 1 mM NaVO₄, pH 7,4) durante 2 hrs. con los anticuerpos primarios correspondientes, o durante toda la noche a 4° C. Luego, se agregó proteína A/G-agarosa (Santa Cruz) o proteína G-agarosa (Sigma), previamente lavadas con *buffer* de lisis durante 1 hr. a 4° C para precipitar los inmunocomplejos. Posteriormente, los complejos se lavaron en *buffer* de lisis, y se hirvieron en *buffer* de siembra previo a la corrida electroforética.

6.6 Medición del consumo de O₂ mitocondrial

El consumo de oxígeno se determinó polarográficamente con un electrodo tipo Clark colocado en una cámara de vidrio de 3 ml a 30° C. El electrodo consiste en una celda de dos electrodos con un cátodo de platino y un ánodo de plata. Una membrana de polietileno permeable al O₂ se aplica sobre el electrodo, con una película de 2,33 M KCl entre ellos. La corriente que se genera es controlada por la velocidad de difusión y, por lo tanto, proporcional a la concentración de oxígeno. El electrodo se calibra con *buffer* de reacción termostaticado a 30 °C y ajustado como 100 % de O₂ (220 μM), mientras que el 0 % se calibró con el agregado de hidrosulfito de sodio. El medio de reacción fue (manitol 0,23 M, sacarosa 70 mM, Tris-CCl 30 mM, MgCl₂ 4 mM, Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 5 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4) saturado con aire (225 μM O₂). El experimento necesita una concentración de proteínas comprendida entre 0,5-1 mg prot/ml. El consumo de O₂ se determinó con malato/glutamato 6 mM como sustrato (para el complejo I), o con Succinato 6 mM (para el complejo III) en presencia (estado 3) o ausencia (estado 4) de ADP 0,2 mM. El consumo de oxígeno se expresó en ng at.O min⁻¹mg de prot⁻¹. El control respiratorio, que expresa la integridad de la membrana interna mitocondrial y el nivel de acoplamiento entre la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa, se calculó con la fórmula CR= estado 3/estado 4.

6.7 Ensayos Enzimáticos

6.7.1 Medición de actividad de NOS

La actividad de NOS se determinó midiendo la conversión de [3H]L-arginina a [3H]L-citrulina, como fue previamente descrito por Knowles y Salter (1998), con modificaciones menores. Cada preparación (100 μg de proteínas) fue incubada con 100 μM L-Arg (para mitocondrias o citosoles), 5 μl/ml [3H]L-arginina (Ae 53.4 Ci/mmol, 5 μCi.ml⁻¹), 100 μM NADPH, 0,1 μM calmodulina, 0,5 mM CaCl₂, 1 μM FAD, 1 μM FMN y 1 μM tetrahydrobiopterina en un volumen final de 100 μl. Luego de 10 minutos de incubación a 37°C la reacción fue detenida por el agregado de 300 μl de *buffer* HEPES (HEPES 15 mM, H-EDTA 1,5 mM, pH 5,5). La [3H]L-arginina no consumida fue separada de la mezcla de reacción por agregado de una suspensión 1:2 de resina de intercambio catiónico Dowex AG 50WX-8. Esta mezcla fue agitada vigorosamente para favorecer el pegado de la [3H]L-arginina a la resina y luego centrifugada 30 segundos a máxima velocidad. Se tomaron 400 μl del sobrenadante que fueron mezclados con 1 ml de líquido de centelleo. Las muestras se midieron durante 1 minuto

en un contador de centelleo líquido para partículas beta (Wallac, 1414 Liquid centillation counter). Las cuentas por minuto (cpm) se convirtieron a nmoles $[3H]L$ -citrulina. $\text{min}^{-1}.\text{mg}$ proteína $^{-1}$ utilizando totales (muestras sin resina) y blancos (sin proteína). La actividad específica de NOS se determinó luego de restarse las cpm obtenidas en presencia de EGTA en una concentración de 2 mM.

6.7.2 Medición de peróxido de hidrógeno en mitocondrias

La producción de H_2O_2 se monitoreó continuamente en un espectrofluorómetro Hitachi F- 2000 (Hitachi Ltd, Tokio, Japón) con longitudes de onda de excitación y emisión de 315 y 425 nm respectivamente (Poderoso J.J., 1996). El ensayo se realizó en 50 mM *buffer* fosfato, 50 mM L- valina, pH 7,4, suplementado con 12,5 U/ mL peroxidasa de rábano, 250 μM ácido *ph*hidroxifenilacético y 0,15 mg/ml de proteína mitocondrial, con malato-glutamato 6 mM como sustrato para determinar la producción de H_2O_2 por el complejo I. Para explorar los efectos de la utilización del NO y la actividad de mtNOS sobre la velocidad de producción mitocondrial de H_2O_2 , el ensayo se inició con 0,1 mM L- Arginina como se describe en el trabajo de (Riobó M., 2002). Para determinar la tasa de producción de H_2O_2 dependiente de NO, se agregó 1 mM L-NAME a las preparaciones mitocondriales en los casos apropiados. Todas las variaciones fluorométricas en las diferentes condiciones se deben al H_2O_2 , ya que son completamente inhibidas por 3 μM catalasa. Para uniformar la máxima tasa de producción de H_2O_2 , en todos los casos las preparaciones mitocondriales fueron suplementadas con 1 mM SOD- *mimetic* TBAP

6.7.3 Medición de la actividad de SOD

La actividad de la SOD fue ensayada por el método descrito por (Spitz y Oberley, 1989). Se realizó un ensayo de inhibición competitiva usando el complejo xantina (50 mM) - xantina oxidasa (3,5 mU/ml) como sistema generador de anión superóxido para reducir al citocromo c^{3+} (2 mM) agregado al medio de reacción. La reducción de citocromo *c* fue monitoreada espectrofotométricamente a 550 nm. Se realizó una curva de calibración haciendo el ensayo en presencia de concentraciones crecientes de SOD comercial, y obteniendo la relación entre el grado de inhibición de la reducción del citocromo *c* y la concentración de SOD. Se definió 1 U enzimática de SOD como la cantidad de enzima capaz de inhibir el 50% de la reducción de citocromo *c* en las condiciones del ensayo. Se determinó la actividad de la Mn-SOD en 100 μg de proteínas mitocondriales. El grado de inhibición de reducción de citocromo *c* obtenido fue extrapolado en la curva de calibración y así se determinaron las unidades enzimáticas de Mn-

SOD de cada muestra. La isoforma mitocondrial de SOD (MnSOD) es insensible al cianuro, y por lo tanto se agrega 1 mM KCN para inhibir a la citocromo oxidasa que, de otra manera, reoxidaría al citocromo *c*, interfiriendo en la medición. La reacción se realizó en *buffer* fosfato (50 mM KPi, pH 7,8, 0,1 mM EDTA) a 25 °C.

6.7.4 Medición de la actividad de Catalasa

La actividad de la enzima se determinó espectrofotométricamente mediante el consumo de H₂O₂, según el método descrito por (Cohen, G., 1970) con modificaciones. Se realizó una curva de calibración haciendo el ensayo en presencia de concentraciones crecientes de H₂O₂ comercial ($E_{240\text{ nm}} = 39,4\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 1 U de catalasa corresponde a 1 μM de H₂O₂ consumido/min. mg de proteína. La reacción se midió a 240 nm durante 100 segundos, a 25°C en *buffer* fosfato (50 mM, pH 6,8) agregando 25, 50 ó 100 μg de muestra. Se calculó *k'* para cada concentración de proteínas, se determinó *k'*/mg prot. por regresión lineal y por interpolación en la curva de calibración se obtuvieron las U cat/mg prot.

6.7.5 Actividad de la actividad de Sirt3

La actividad desacetilasa de Sirt3 se determinó como se describe en el kit de ensayo provisto por el fabricante, Cayman (Nº de artículo 10011566). Brevemente, en una placa para fluorescencia de 96 pocillos se incubaron el *buffer* de ensayo, el péptido acetilado p53 modificado, Sirt3 recombinante y NAD con concentraciones crecientes de ONOO⁻ (100, 250, 500 μM) o con lisados mitocondriales purificados en un volumen final de 50 μl. Las reacciones de desacetilación se detuvieron después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente mediante la adición de 50 μl de solución de *STOP*. La liberación del fluoróforo por desacetilación del péptido p53 se analizó con un fluorómetro utilizando 350-360 nm como longitud de onda de excitación de y 450-465 nm como longitud de onda de emisión (Schwer B., 2002).

6.7.6 Medición de la actividad de la enzima citrato sintasa

La actividad de la enzima citrato sintasa es una medida de la pureza de la fracción mitocondrial luego de realizar el fraccionamiento celular, pero también es posible tener una medida de la cantidad de mitocondrias que posee una muestra control en relación a una tratada. Para la medición se colocó en una cubeta de 1 cm de paso óptico 810 μl de agua, 100 μl solución de DTNB (4 mg de ácido 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoico) en 10 ml de 1 M Tris-HCl, pH 8,1), 30 ul de solución de acetil-CoA (10 mg/ml) y 10 μl de homogenato de cerebro que contengan

entre 0,02-0,2 mg de proteína, se mezclaron y se colocaron en el espectrofotómetro y se siguió la reacción a 412 nm durante 2 min para descartar la actividad de la acetil-Coa hidrolasa. Por último, para iniciar la reacción se agregan 50 µl de oxalacetato (OAA) (13,2 mg en 10 ml de agua) el cambio en la absorbancia se siguió durante 5 min de reacción para así calcular la cantidad de citrato producida por min y por mg de proteína.

6.7.7 Medición de la actividad del complejo I (NADH-ubiquinona reductasa)

Para la determinación de la actividad del complejo I se utilizaron mitocondrias que fueron expuestas a 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento a fin de lograr la pérdida de la integridad de las membranas mitocondriales con la subsecuente liberación de los complejos respiratorios. La actividad se determinó espectrofotométricamente a 30°C. Cincuenta microgramos de proteínas mitocondriales fueron incubados en 0,9 ml de *buffer* KPi 100 mM a pH 7,2. Se midió la reducción sensible a la inhibición por rotenona de 50 µM 2,3-dimetoxi-6-metil-1,4-benzoquinona con 1 mM KCN como inhibidor de la citocromo oxidasa ($\epsilon_{550\text{nm}} = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y malato-glutamato 6 mM como sustrato, a 340 nm durante 120 segundos.

6.7.8 Medición de actividad de Succinato-ubiquinona –citocromo c reductasa (Complejos II-III)

La actividad succinato-citocromo c reductasa se determinó espectrofotométricamente a 30 °C. 0,05 mg de proteínas fueron incubados en 0,9 ml de *buffer* de fosfato de potasio 100 mM pH 7,2. Se midió la reducción de citocromo c a 550 nm ($\lambda_{550\text{nm}} = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) en presencia de 50 µM citocromo c, 1 mM KCN como inhibidor de la citocromo oxidasa, y 10 mM succinato como dador de electrones.

6.7.9 Medición de la actividad de Citocromo c oxidasa (Complejo IV)

La actividad de citocromo oxidasa fue monitoreada espectrofotométricamente por la oxidación de 50 µM de citocromo c reducido en un espectrofotómetro Hitachi U-3000 a 550 nm ($\epsilon_{550\text{nm}} = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La reacción se llevó a cabo con 50 µg de proteína mitocondrial en *buffer* KPi 100 mM pH 7,2 a 30°C. La velocidad de la reacción fue determinada como la pseudoconstante de primer orden k' y expresada como $k' \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de prot}^{-1}$.

6.7.10 Preparación de citocromo c reducido

Se disolvieron 24,8 mg de citocromo c en 2 ml de *buffer* KPi 10 mM, pH 7,2 y se añadieron 10 mg de ácido ascórbico (reductor). Luego, se pasó por una columna de Sephadex G25 para eliminar el ácido ascórbico en exceso, eluyendo con KPi 10 mM. Se tituló

espectrofotométricamente a 550 nm haciendo una dilución previa 1:20 en *buffer* KPi 10 mM, pH 7,2. $\epsilon_{550nm}=21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

6.8 Aislamiento de células a partir de tejido cerebral

Se extrajo el cerebro, se colocó en placa de petri refrigerada y se eliminaron las meninges utilizando agujas y pinzas estériles. Se disgregó mecánicamente el tejido con un bisturí y una tijera. Posteriormente, se incubó el tejido en *buffer* de digestión (tripsina-EDTA 0,25% en PBS) entre 10-15 minutos a 37°C en agitación (100 ciclos/min). Se finalizó la digestión con 3 ml de SFB, se filtraron las muestras con gasa estéril y se centrifugaron 10 min a 1100 rpm. Se resuspendió el pellet en DMEM-F12 alta glucosa + 10% SFB. Se contaron las células en cámara de Neubauer evaluando la viabilidad mediante el uso de Azul de Tripán.

6.9 Ensayos de citometría de flujo.

6.9.1 Producción mitocondrial de NO

Las mitocondrias (1 mg proteínas/ml) se incubaron en *buffer* MSHE por 30 minutos a 37°C con 10 μM DAF-FM (diamino fluoresceína diacetato) y 0,5 μM MitoTracker (marcador de mitocondrias) y la fluorescencia resultante se midió por citometría de flujo en un Ortho Cytron Absolute Flow-Cytometer (Johnson & Johnson, Raritan, NY). Se evaluaron los histogramas del número de eventos en función de la intensidad de fluorescencia para DAF-FM correspondiente al canal FL1.

6.9.2 Producción intracelular de especies reactivas del oxígeno (ROS), de superóxido y la masa mitocondrial

La producción intracelular de ROS, la producción de superóxido y la masa mitocondrial fueron analizadas mediante citometría de flujo (FACScalibur). Brevemente, 10^6 células se resuspendieron en HBSS (suplementado con 1 mM CaCl_2 y 1 mM MgCl_2 , pH 7,4) y se incubaron con 5 μM 2', 7'- diclorofluoresceína diacetato (DHCF-DA), 5 μM MITOSOX (Invitrogen) o 10-Nonil Bromil naranja de acridina (NAO) por 30 min a 37°C en oscuridad. Se utilizó yoduro de propidio (0,005%) para detectar las células muertas. Para cada análisis se adquirieron entre 20.000 y 40.000 eventos totales. Se evaluaron los histogramas del número de eventos en función de la intensidad de fluorescencia en el canal verde o FL1 para DHCF y en el canal rojo o FL2 para Mitsox y NAO. Posteriormente, se analizaron los datos con el software Flowing.

6.9.3 Determinación del potencial de membrana mitocondrial

El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_{mit}$) se determinó por citometría de flujo utilizando el fluorocromo catiónico DiOC₆ (3,3'-dihexiloxacarbocianina) que atraviesa la membrana mitocondrial y se acumula en la matriz debido al potencial eléctrico negativo que existe allí. Mitocondrias frescas de tejido nervioso (50 µg proteína/ml) fueron suspendidas en 0,5 ml de *buffer* de reacción [120 mM KCl, 5 mM KH₂PO₄, 1 mM EGTA, 3 mM HEPES y 1 mg/ml de BSA libre de ácidos grasos (pH 7,4)] y se les adicionó DiOC₆ (200 nM) en oscuridad a 37°C por 15 min. Posteriormente, el contenido de la cubeta fue centrifugado 5 min a 10.000 x g para obtener el pellet mitocondrial, el cual se resuspendió en 200 µl de *buffer* MSHE para luego registrar la fluorescencia. La señal de DiOC₆ fue analizada en el estado 4 de respiración mitocondrial en presencia de 6 mM de succinato. Como control positivo la despolarización total fue inducida por 2 µM Carbonil Cianuro p-Trifluorometoxifenil Hidrazona (FCCP).

6.10 Relación mitocondrial NAD/NADH y contenido de ATP.

6.10.1 Relación mitocondrial NAD/NADH

Se utilizaron 50 µg de mitocondrias aisladas de tejido nervioso de ambos genotipos para determinar la relación NAD/NADH mitocondrial mediante el kit de cuantificación de NAD/NADH de Abcam (ab65348) a través de seguimiento de una reacción colorimétrica a una DO de 450 nm en un lector de microplacas siguiendo las indicaciones del fabricante.

6.10.2 Contenido de ATP

El contenido total de ATP se determinó en 10 mg de tejido nervioso fresco usando el kit de ensayo bioluminiscente ATP (Molecular Probes). Dicho ensayo se basa en el requerimiento de la luciferasa por ATP para producir luz (emisión máxima ~ 560 nm a pH 7,8)

6.11 Morfología mitocondrial

La microscopía electrónica de transmisión electrónica se realizó en secciones de tejido de 90 nm de cerebros de ambos genotipos en diferentes etapas del envejecimiento. El tejido se fijó en paraformaldehído al 4%, glutaraldehído al 2% y sacarosa al 5% en PBS, seguido de una post-fijación de 2 horas en tetróxido de osmio al 1% y luego 1 hora en acetato de uranilo en etanol al 50%. Las muestras se lavaron con etanol al 50% y se deshidrataron con series graduadas de etanol, se clarificaron con acetona y se embebieron en Vestopal. Se prepararon grillas y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las muestras se observaron a 100

kV con un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM-109-T (Zeiss, Oberkochen, Alemania). Para determinar la morfología mitocondrial se midieron al menos 400 mitocondrias por ratón usando el software ImageJ y los criterios descritos en (Gonzalez A. S., 2014).

6.12 Protocolo de extracción de ADN total

Muestras de colas/orejas para genotipificación o de tejido nervioso (~ 10 mg) para la determinación de la relación ADN_m/ADN_g se homogeneizaron en *buffer* Tris-EDTA con proteinasa K (20 mg/ml). El ADN total se precipitó con isopropanol (volumen 1: 1) y luego se centrifugó a 10.000 x g por 10 min a 4 C. El pellet fue lavado con etanol 70% frío y por último fue resuspendido en *buffer* TE o agua y cuantificado a 260nm.

6.13 Protocolo de extracción de ARNm

Se homogenizó el tejido en trizol (25 mg de tejido en 1 ml trizol) en homogenizador de vidrio pequeño estéril. Luego, se centrifugó a 12.000 g por 10 minutos. El sobrenadante se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y se le agregaron 0,2 ml de cloroformo. Se mezcló vigorosamente y luego se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 3 minutos. Se centrifugó a 11.500 x g por 15 minutos (2-8°C). Se tomó con cuidado la fase acuosa, a la cual se le agregaron 0,5 ml de isopropanol. Se agitó con *vortex* y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se volvió a centrifugar a 11.500 x g por 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se agregó un 1 ml de etanol 75% para lavar el pellet. Se agitó con *vortex* y se recentrifugó a 7.500 x g durante 5 minutos. Se secó bien el pellet y luego se lo disolvió en H₂O DEPC.

Se midió la absorbancia a 260 nm (ácidos nucleicos) y a 280 nm (proteínas con aminoácidos aromáticos) para las muestras (10 µl muestra + 490 µl de H₂O destilada o 2 µl muestra + 180 µl de H₂O destilada si se tiene poco volumen final de ARN) y se calculó la relación A₂₆₀/A₂₈₀ (Índice de contaminación de ARN con proteínas. Se espera un índice en el rango de 1-2). Se calculó la concentración conforme a la siguiente ecuación:

$$A_{260} \times 40 \text{ (coeficiente de absortividad molar)} \times 50 \text{ (factor de dilución)} = \mu\text{g ARN/ml}$$

6.14 Real time RT-PCR

El ADN_c (ADN copia) se sintetizó a partir del ARN total mediante transcripción reversa o retrotranscripción (RT). Para realizar la RT se usaron 2 µg de ARN en 10 µl finales (llevando

a volumen final con H₂O DEPC) por tubo. Se trabajó sobre hielo y se prepararon dos juegos de tubos: muestras sin y con retrotranscriptasa. Se preparó la mezcla de reacción para RT usando el kit de Promega (por tubo y para un volumen final de reacción de 20 µl: 4 µl *buffer* 5X, 1 µl dNTPs mix [1 mM], 0,25 µl OligodT [25 ng], 0,5 µl ARNsin [20U], 3,25 µl H₂O DEPC, 1 µl de retrotranscriptasa [200U] o H₂O DEPC). Se mezclaron 10 µl de mix con 10 µl de la muestra. Se llevó al ciclador y se ejecutó el siguiente programa para la RT:

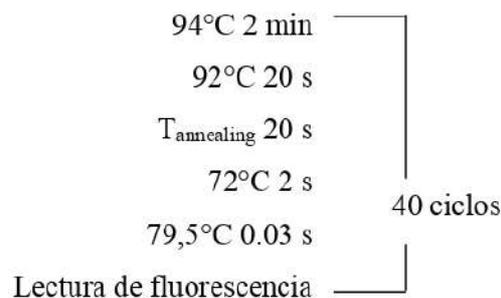
- 39°C x 1 hora.
- 65°C x 10 minuto.
- 4°C x infinito (hold).

Luego las muestras fueron guardadas a 4°C hasta realizar la PCR.

6.14.1 PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

El ADNc se amplificó por qPCR utilizando 1 µl del ADNc obtenido en la RT, en una mezcla de reacción con *buffer* de reacción (1X); MgCl₂ (2 mM); oligos específicos (0,4 µM); dNTPs (0,2 mM); 0,025 µl de SYBRgreen y 0,03 U/µl de Taq ADN polimerasa recombinante (Promega) en un volumen final de 25 µl. Los primers utilizados se encuentran en la Tabla 1.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Applied Biosystems Step One. El programa de amplificación estándar se detalla a continuación:



Cada reacción: Curva de “melting” de 65 a 91°C cada 0,2°C. El experimento se repitió al menos dos veces. Los datos obtenidos se analizaron utilizando el software Opticon 3 trazando una recta en la parte exponencial de la curva de amplificación y obteniendo así los valores de C_T. El cálculo de la inducción de la expresión de los genes analizados se basa en el método del DDC_T (Current Protocols in Molecular Biology). Se estimó el promedio de los valores de C_T

para el gen incógnita y para el NoRT (ARN que había sido incubado en las condiciones de la reacción de RT, pero en ausencia de la enzima retro-transcriptasa) de la siguiente manera:

$$C_T = (C_{T1} + C_{T2})/2 \quad (1)$$

La diferencia en los valores de C_T entre cada muestra y el No RT determina el delta- C_T (ΔC_T). Esto se resume en la siguiente expresión:

$$\Delta C_T = (C_{T\text{NoRT}}) - (C_T^{\text{muestra}}) \quad (2)$$

Una vez normalizado y debido al exponente natural de qPCR, los valores son transformados a medidas relativas de veces de inducción (VI_a) para una mejor comparación entre los experimentos:

$$VI_a = 2^{\Delta C_T} \quad (3)$$

Luego, se normalizaron nuevamente los niveles de ADNc de las muestras con su correspondiente control de carga (Actina) de la siguiente manera:

$$VI_b = VI_a^{\text{muestra}} / VI_a^{\text{GAPDH}} \quad (4)$$

Donde VI_b representa las veces de inducción normalizada a GAPDH. Finalmente, los datos se normalizaron respecto al control (VI_n).

$$VI_n = VI_b^{\text{muestra}} / VI_b^{\text{control}} \quad (5)$$

Para el cálculo de errores de cada medición se obtuvo el desvío estándar (ds) de las mediciones del C_T de las muestras tratadas y no tratadas del gen y del control de GAPDH de los datos obtenidos para cada tratamiento:

$$ds = \sqrt{\frac{\sum(C_T + \bar{C}_T)^2}{n-1}} \quad (6)$$

Donde n es el tamaño de la muestra.

Luego, el error se calculó como la raíz cuadrada de la suma de los errores de los C_T de las muestras, de los C_T de los No RT y de los C_T de GAPDH (Smith *et al.* 2004), aplicando la siguiente fórmula:

$$E = [(ds/ C_T)^2 \text{ muestra} + (ds/ C_T)^2 \text{ noRT} + (ds/ C_T)^2 \text{ GAPDH}]^{1/2} \quad (7)$$

Estos datos se multiplicaron por las veces de inducción finales.

6.14.2 Determinación de la relación ADNmt/ADNa

El análisis de qPCR del número de copias ADNmt permite una detección rápida y eficaz del contenido de ADN mitocondrial.

La relación ADNmt/ADNn se calculó usando el método $2^{\Delta CT}$ con primers específicos para el ribosoma 16s en el caso del ADNmt y primer de β -2-microglobulina (β 2M) para el ADNn.

El contenido relativo de ADNmt = $\text{ADNmt muestra} / \text{ADNmt control} = [(2 \times 2^{\Delta CT \text{ muestra}}) / (2 \times 2^{\Delta CT \text{ control}})]$ como se explica en el trabajo de Vanegas y colaboradores (Vanegas V., 2011).

6.14.3 Corrida electroforética en gel de en agarosa 2%

Se preparó el gel solubilizando 2 gramos de agarosa en 100 ml de TAE 1X. Se agregaron 5 μ l del colorante SYBR® Safe Invitrogen (10 mg/ml). Luego, se vertió el contenido en la cuba y se dejó gelificar. Se sembró todo el volumen de producto de PCR + 7-10 μ l de *buffer* de siembra 2X, 5 μ l de marcador de ADN de 100pb + 5 μ l de *buffer* de siembra 2X. El gel se corrió en *buffer* TAE 1X, a 100 V aproximadamente durante 20-30 minutos. El gel se sacó de la cuba y se observaron las bandas de los productos de PCR en el transiluminador (luz UV). A continuación, se tomó una foto digital para tener registro del experimento.

6.15 Análisis Estadísticos

La evaluación estadística de los datos se realizó en base a los valores promedio y el desvío estándar (DS) o el error estándar de la media (EEM) de “n” experimentos independientes. Se utilizaron para el análisis de datos ANOVA de dos vías con prueba de Bonferroni comparando todos los grupos y ANOVA de una vía para el análisis de diferencias dentro de cada grupo, con $P < 0,05$ como criterio para la significancia estadística.

7 RESULTADOS

7.1 Establecimiento y *evaluación* de la colonia de ratones $p66^{shc(-/-)}$

Como primer paso para el desarrollo de este proyecto fue necesario establecer en nuestro país la colonia de ratones transgénicos *knock-out* para el gen $p66^{shc}$ ($p66^{shc(-/-)}$). Para esto, se retrocruzaron ratones donados a nuestro laboratorio por el grupo de investigación del Dr. P.G. Pellicci, que los engendró en el Instituto Europeo de Oncología de la Universidad de Milán. Lamentablemente, las hembras $p66^{shc(-/-)}$ mostraron dificultades para la reproducción observándose canibalismo, pocos cuidados maternos y bajo número de crías. Por estos motivos, se optó por usar hembras heterocigotas ($p66^{shc(-/+)}$) con machos *knock-out* ($p66^{shc(-/-)}$) para las maternidades, siendo necesarias periódicas genotipificaciones de las crías mediante PCR con primers específicos para mantener la colonia (Figura 14). Esta estrategia de PCR nos permitió identificar los animales WT de los heterocigotas y de los *knock-out* a partir del *cassette* de resistencia a neomicina que se utilizó para interrumpir el marco de lectura del locus, eliminando $p66^{shc}$ sin afectar a las isoformas $p46^{shc}$ y $p52^{shc}$. Para este trabajo solamente se utilizaron ratones machos a fin de eliminar variables hormonales.

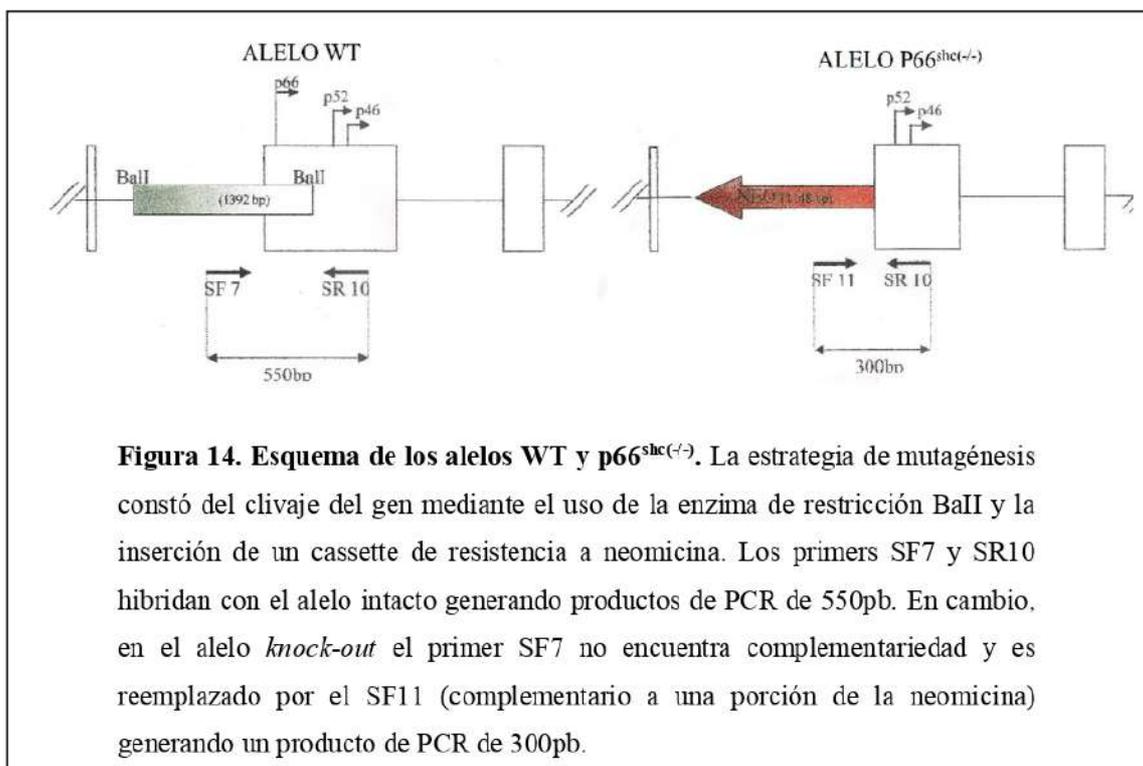


Figura 14. Esquema de los alelos WT y $p66^{shc(-/-)}$. La estrategia de mutagénesis constó del clivaje del gen mediante el uso de la enzima de restricción *BaII* y la inserción de un *cassette* de resistencia a neomicina. Los primers SF7 y SR10 hibridan con el alelo intacto generando productos de PCR de 550pb. En cambio, en el alelo *knock-out* el primer SF7 no encuentra complementariedad y es reemplazado por el SF11 (complementario a una porción de la neomicina) generando un producto de PCR de 300pb.

Resultados

Al igual que otros grupos de investigación, nosotros encontramos que los individuos de esta colonia $p66^{shc(-/-)}$ presentan dificultades para fijar grasas, lo cual se evidencia en una reducción de hasta el 25% de su peso corporal en comparación con los WT. Estos ratones son más delgados y la diferencia de pesos entre genotipos se va acentuando con la vejez (Figura 15). A su vez también, mediante el seguimiento de los ratones machos a lo largo de su vida, se observó un índice de supervivencia 30% superior al de sus compañeros de camada de tipo salvaje, como ya fue descrito previamente en la bibliografía (Figura 16).

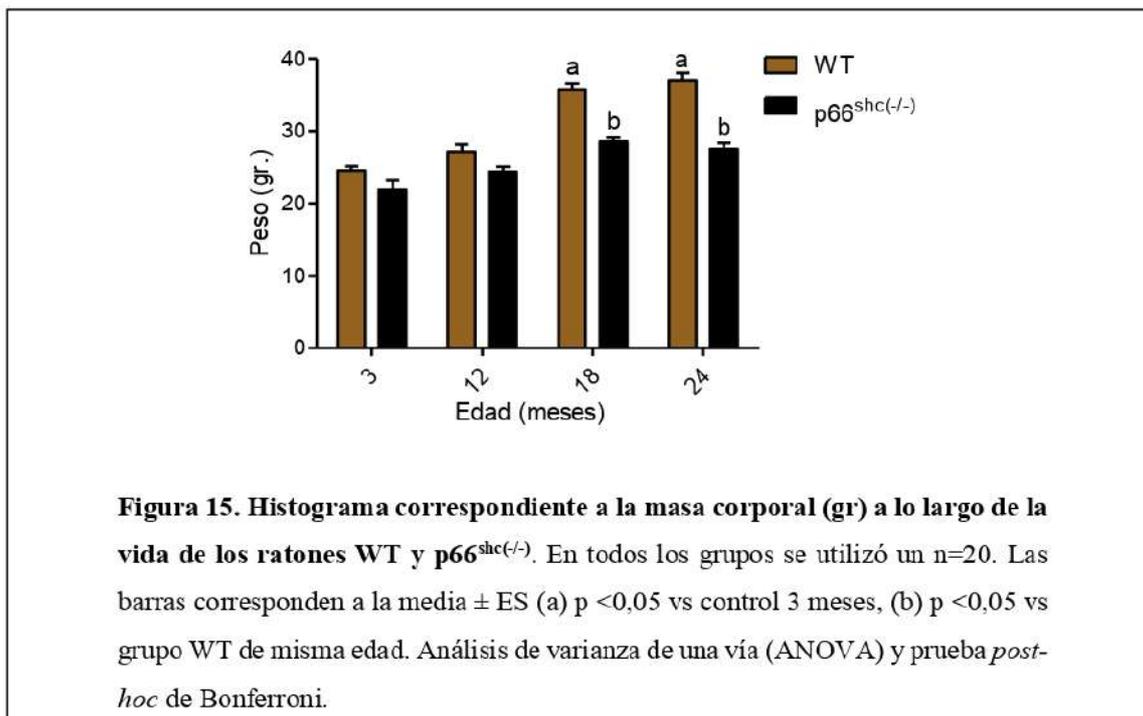


Figura 15. Histograma correspondiente a la masa corporal (gr) a lo largo de la vida de los ratones WT y $p66^{shc(-/-)}$. En todos los grupos se utilizó un $n=20$. Las barras corresponden a la media \pm ES (a) $p < 0,05$ vs control 3 meses, (b) $p < 0,05$ vs grupo WT de misma edad. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba *post-hoc* de Bonferroni.

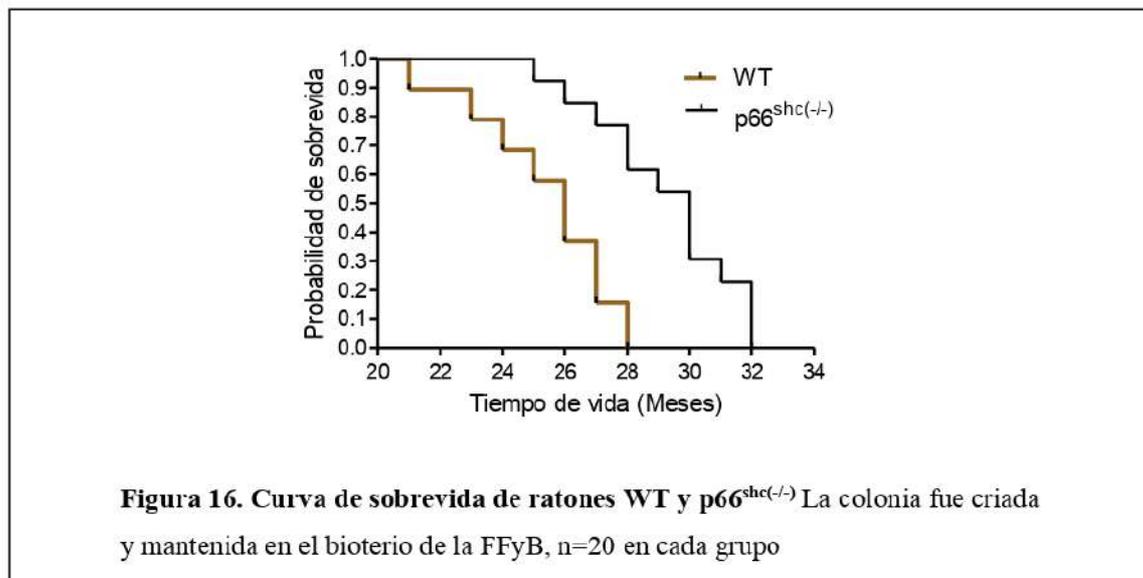
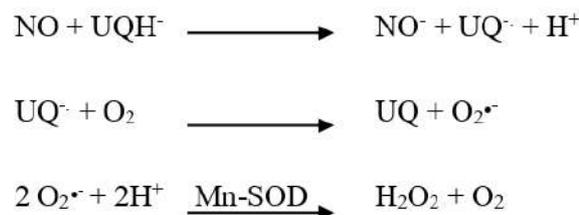


Figura 16. Curva de supervivencia de ratones WT y $p66^{shc(-/-)}$ La colonia fue criada y mantenida en el bioterio de la FFyB, $n=20$ en cada grupo

7.2 El estado redox y la producción de ROS son inversamente regulados en mitocondrias aisladas de tejido nervioso de ratones WT y p66shc^(-/-) durante el envejecimiento

Con el objetivo de comprender cómo participa p66shc en el equilibrio de la homeostasis redox mitocondrial en el envejecimiento, se utilizaron varias técnicas bioquímicas para monitorear diferentes parámetros oxidativos en mitocondrias aisladas de cerebro de ratones WT y p66shc^(-/-) de distintas edades. Se estudió la capacidad de producir H₂O₂ por parte de las mitocondrias aisladas de los diferentes grupos (Figura 17). En presencia de antimicina, inhibidor del Complejo III que promueve la producción máxima de H₂O₂, hubo un incremento significativo en la capacidad máxima de producción de H₂O₂ en ratones WT durante el envejecimiento. Este aumento en la tasa de producción varió en función del uso de malato-glutamato o succinato como sustratos de la cadena de transporte de electrones (ETC) y de la edad. Al comparar el grupo WT más longevo (24 meses) y el grupo WT control (3 meses), las diferencias fueron de 33% y 25% según el sustrato, respectivamente (p < 0,05) (Figura 17A y 17B). Diferencias menos pronunciadas se observaron a edades más tempranas (18 meses), aunque utilizando succinato como sustrato, se observó un aumento en la velocidad máxima de producción de H₂O₂ del 25% en el grupo WT, p < 0,05 (Figura 17B). En cambio, los ratones p66^{shc(-/-)} exhibieron, a partir de los 18 meses de edad, una reducción significativa en la velocidad de producción de H₂O₂ con ambos sustratos en comparación con el grupo joven de 3 meses (41% y 26% respectivamente, p < 0,05) (Figura 17A y 17B).

La suplementación de las mitocondrias de diferentes tejidos con NO promueve un aumento significativo de O₂⁻, ya que el NO inhibe la citocromo oxidasa y la región b-c₁ del complejo III, y aumenta el nivel del radical ubisemiquinona que provee los electrones al O₂. La producción mitocondrial de H₂O₂ libremente difusible depende de la dismutación del O₂⁻ dependiente de NO catalizada por la Mn-SOD.



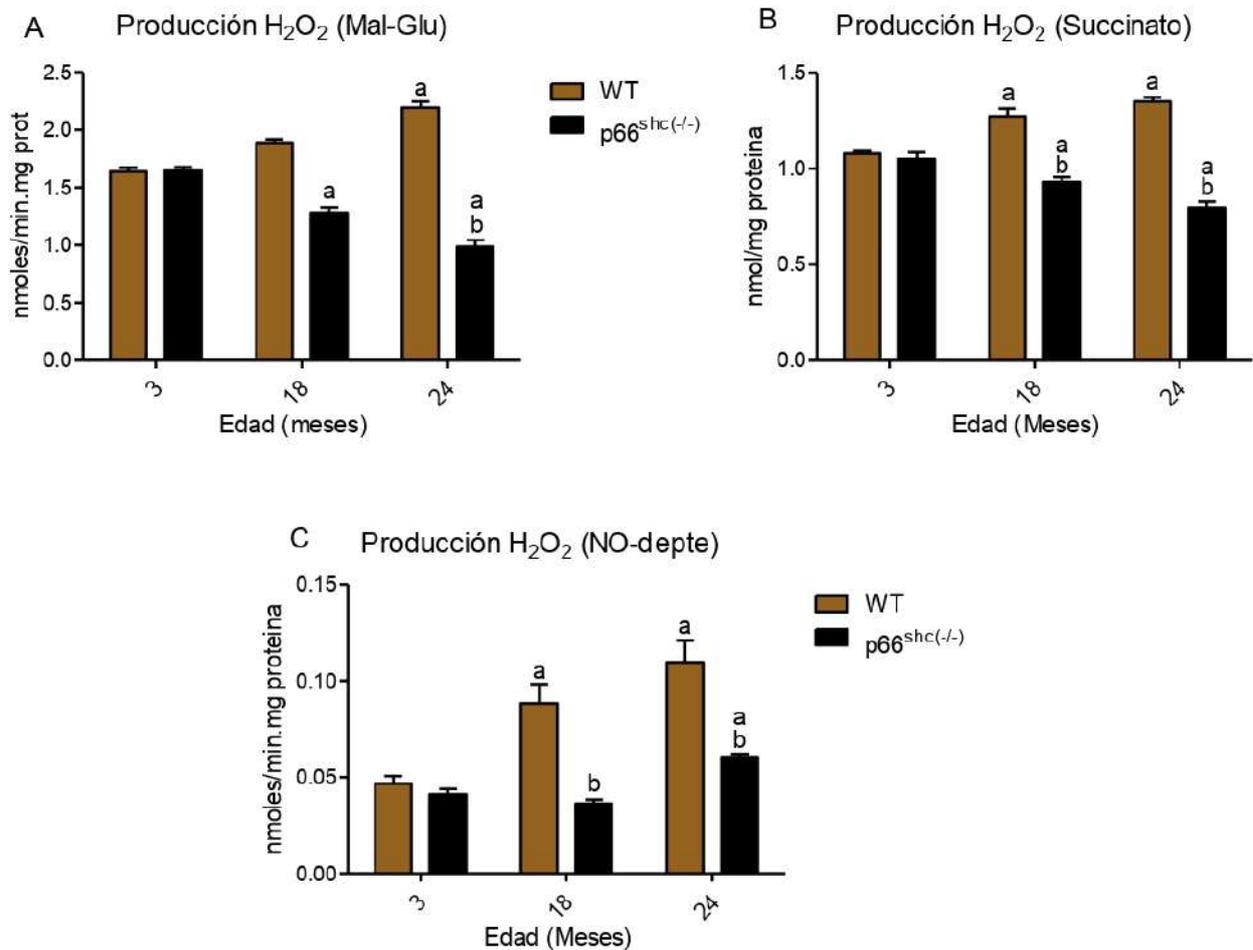
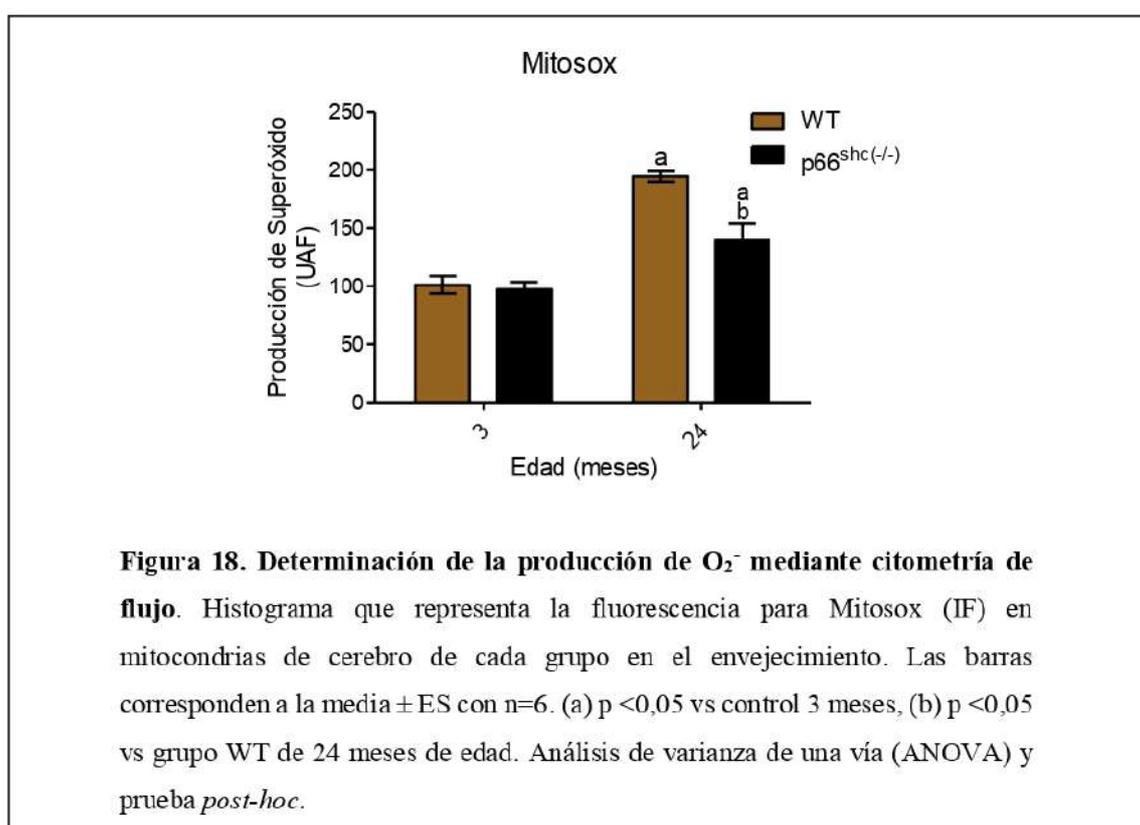


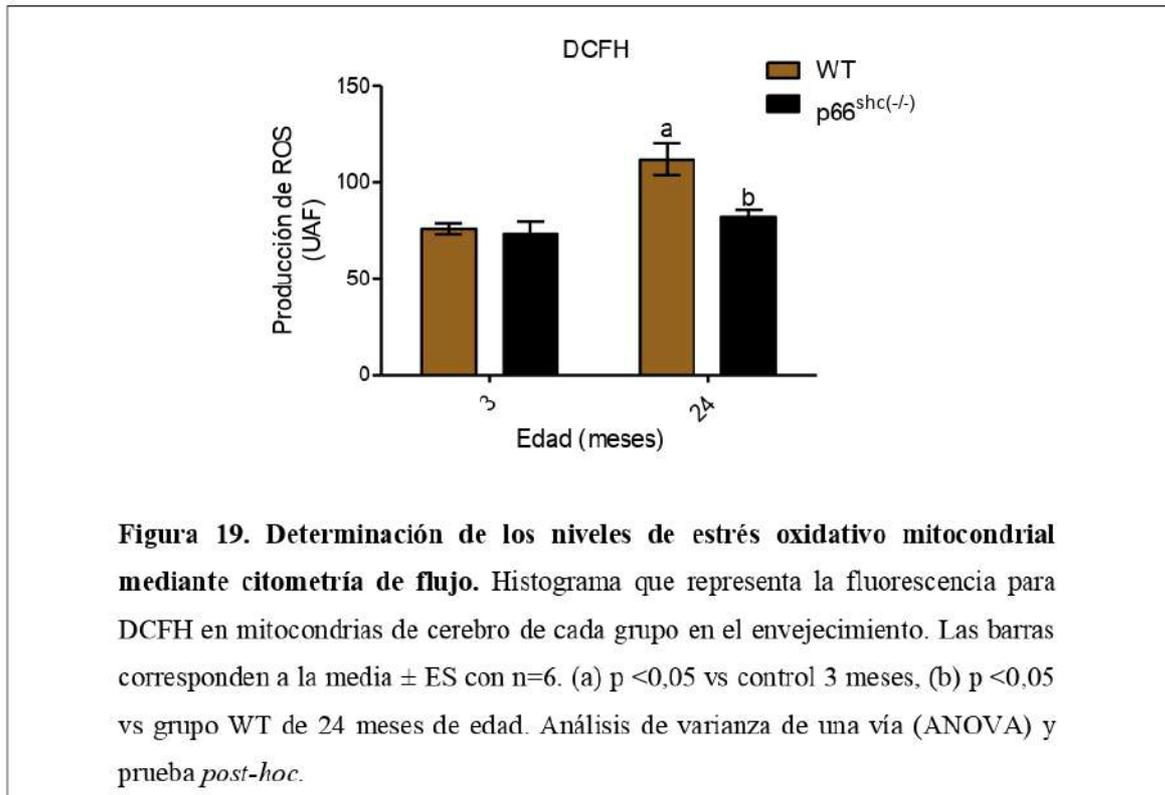
Figura 17. Tasa de producción máxima de H₂O₂ de mitocondrias aisladas. Se utilizaron mitocondrias de cerebros de ratones WT y p66^{shc(-/-)} con (A) Malato/Glutamato (B) Succinato como sustratos y (C) diferencia entre la producción máxima de H₂O₂ en presencia de L-arginina sola y con L-NMMA utilizando Malato/Glutamato como sustrato. Las barras corresponden a la media ± ES con n=6. (a) p < 0,05 vs control 3 meses, (b) p < 0,05 vs grupo WT de la misma edad. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba *post-hoc*.

Para investigar la contribución de la nNOS a la concentración de H₂O₂ en el estado estacionario medimos la tasa de producción de H₂O₂-NO dependiente en presencia de L-arginina sola o con L-NMMA. El aumento en la tasa de producción de H₂O₂ registrado durante el envejecimiento en el grupo WT es explicado en gran medida por la producción dependiente de la producción de NO, que se ve aumentada hasta en un 100% en estadios avanzados de vida, p < 0,05 (Figura 17C). Previamente, nuestro grupo había encontrado una relación entre el envejecimiento y la producción de H₂O₂ dependiente de NO en mitocondrias de cerebro de

ratas wistar. En cambio, los ratones $p66^{shc(-/-)}$ presentaron velocidades más constantes de producción de H_2O_2 dependiente de NO y una disminución de hasta 25% de la misma en los animales más longevos (Figura 17B).

Un efecto similar al de la velocidad máxima de producción de H_2O_2 se observó en la generación de superóxido ($O_2^{\bullet-}$) mitocondrial y en la producción general de ROS mediante ensayos de citometría de flujo con sondas específicas en mitocondrias de cerebros de ambos grupos durante el envejecimiento. El reactivo MitoSOX Red es un novedoso colorante fluorogénico dirigido específicamente a las mitocondrias en células vivas. La oxidación de la sonda MitoSOX por superóxido, pero no por otros sistemas generadores de ROS o RNS, produce fluorescencia roja que es posible cuantificar mediante citometría de flujo o microscopía. De la misma manera, la DCFH, sonda ampliamente utilizada en la literatura como indicador de estrés oxidativo, emite fluorescencia verde al oxidarse en presencia de ROS. Concomitantemente, la generación de superóxido y la tasa de producción de ROS, aumentó abruptamente en el grupo WT durante el envejecimiento (92% y 46% respectivamente, $p < 0,05$) mientras que en ratones gerontes $p66^{shc(-/-)}$ el aumento en comparación con el grupo control joven fue más atenuado (38% y 8%, respectivamente, $p < 0,05$) (Figura 18 y 19).





A su vez, es interesante conocer la respuesta de desintoxicación antioxidante en este modelo de envejecimiento con bajos niveles de ROS. Con este fin, se estudió la expresión y la actividad de la superóxido dismutasa (MnSOD) en fracciones mitocondriales y de la catalasa en la fracción citosólica. Nuestros resultados mostraron que la pérdida de actividad antioxidante de MnSOD que se produce durante el envejecimiento fue más pronunciada en ratones WT que en el grupo KO. Gracias al seguimiento a 550 nm de la reacción de reducción del citocromo *c*, pudimos observar una disminución de la actividad de la MnSOD mitocondrial del 19% en el Grupo WT y del 13% en el grupo p66^{shc(-/-)} cuando comparamos individuos de 24 meses de ambos grupos con ratones control de 3 meses de edad, $p < 0,05$ (Figura 20). De la misma manera, mediante Real Time PCR se observó una leve disminución en la transcripción del gen en ambos grupos durante el envejecimiento, $p < 0,05$ (Figura 21). Curiosamente dicha diferencia no se mantuvo al analizar la expresión de la proteína por Western Blot (Figura 22).

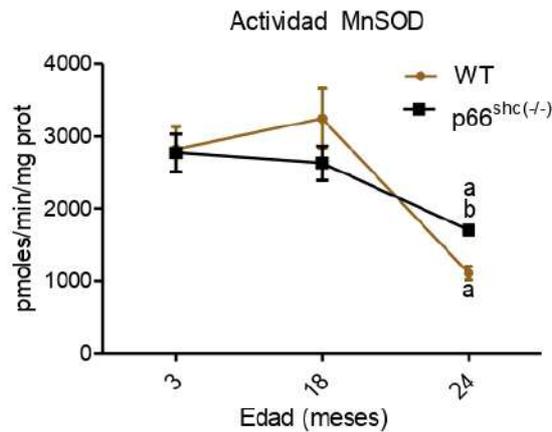


Figura 20. Determinación de la actividad de MnSOD a partir del seguimiento de la reducción del cit *c* por el sistema Xantina/Xantina oxidasa a 550nm. Histograma que representa la actividad de MnSOD durante el envejecimiento en mitocondrias de cerebro de cada grupo. Las barras corresponden a la media \pm ES con $n=6$. (a) $p < 0,05$ vs control 3 meses, (b) $p < 0,05$ vs grupo WT de la misma edad. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba post hoc.

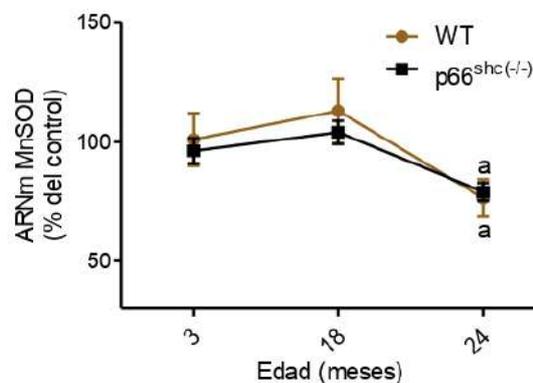
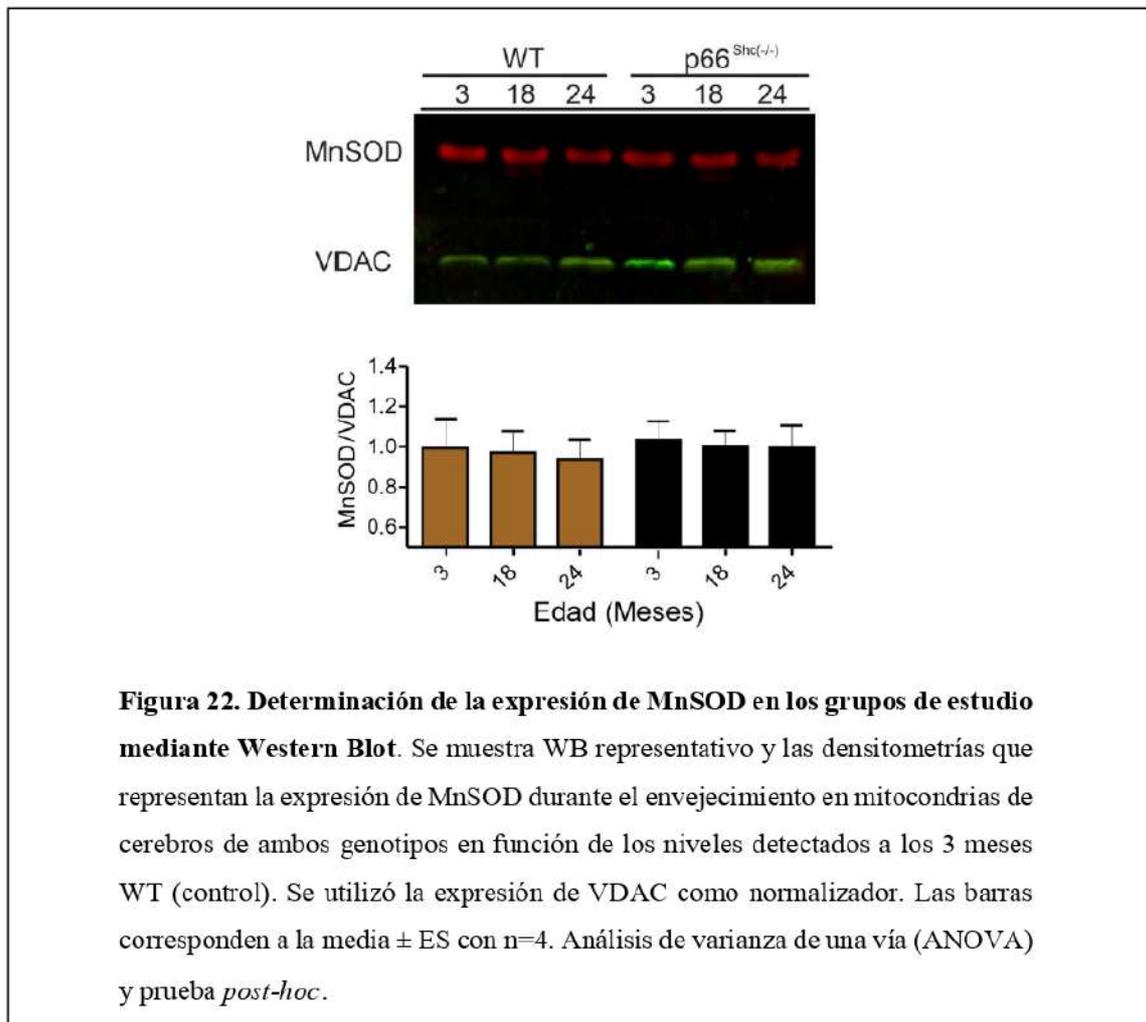


Figura 21. Determinación del contenido de ARNm de MnSOD mediante Real Time qPCR. Histograma que representa los niveles de expresión de ARNm de MnSOD durante el envejecimiento en tejido cerebral de ambos genotipos relativo a los niveles detectados en el grupo (control) 3 meses WT. Se utilizó el ARNm de GADPH como normalizador. Las barras corresponden a la media \pm ES con $n=8$. (a) $p < 0,05$ vs control 3 meses, (**) $p < 0,05$ vs grupo WT de misma edad. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba *post-hoc*.



En cambio, en el caso de la catalasa, ni su actividad obtenida a través del seguimiento de la absorbancia a 240nm por desaparición del H₂O₂ ni su transcripción evaluada por Real Time PCR presentaron diferencias entre los grupos WT y p66^{shc(-/-)} durante el envejecimiento, (Figura 23 y Figura 24).

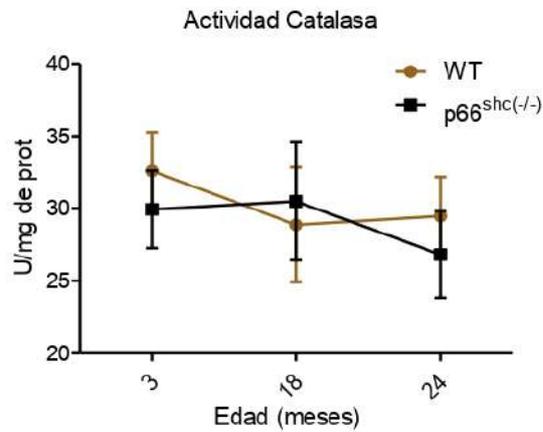


Figura 23. Determinación de la actividad de Catalasa a partir del seguimiento de la reacción de desaparición de H_2O_2 a 240nm. Histograma que representa la actividad de Catalasa (unidades enzimáticas por mg de proteína) a los 3, 18 y 24 meses de edad en tejido cerebral de cada grupo. Las barras corresponden a la media \pm ES con n=6. Análisis de varianza de una vía (ANOVA).

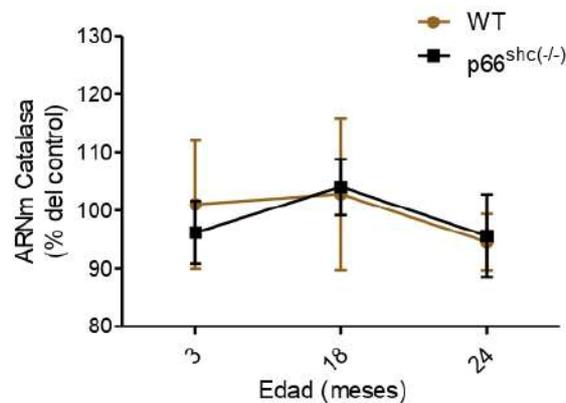
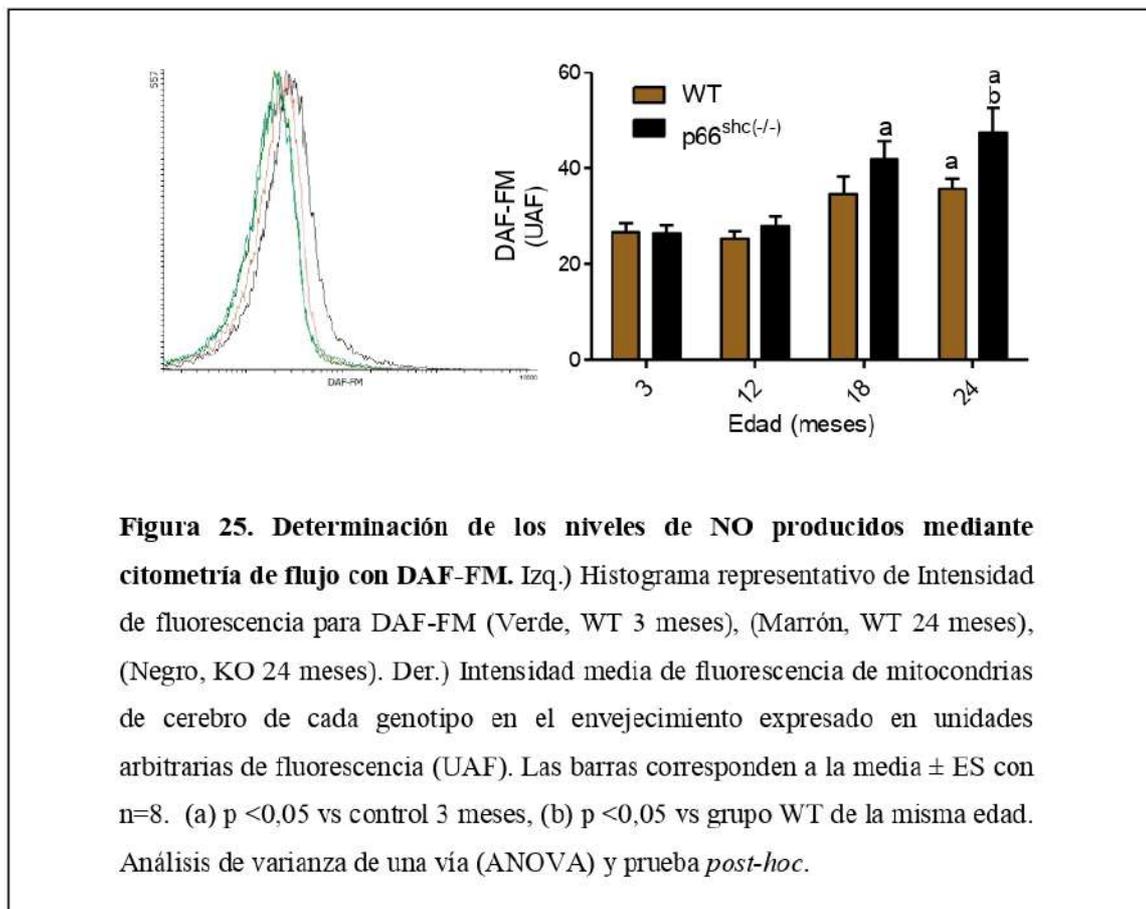


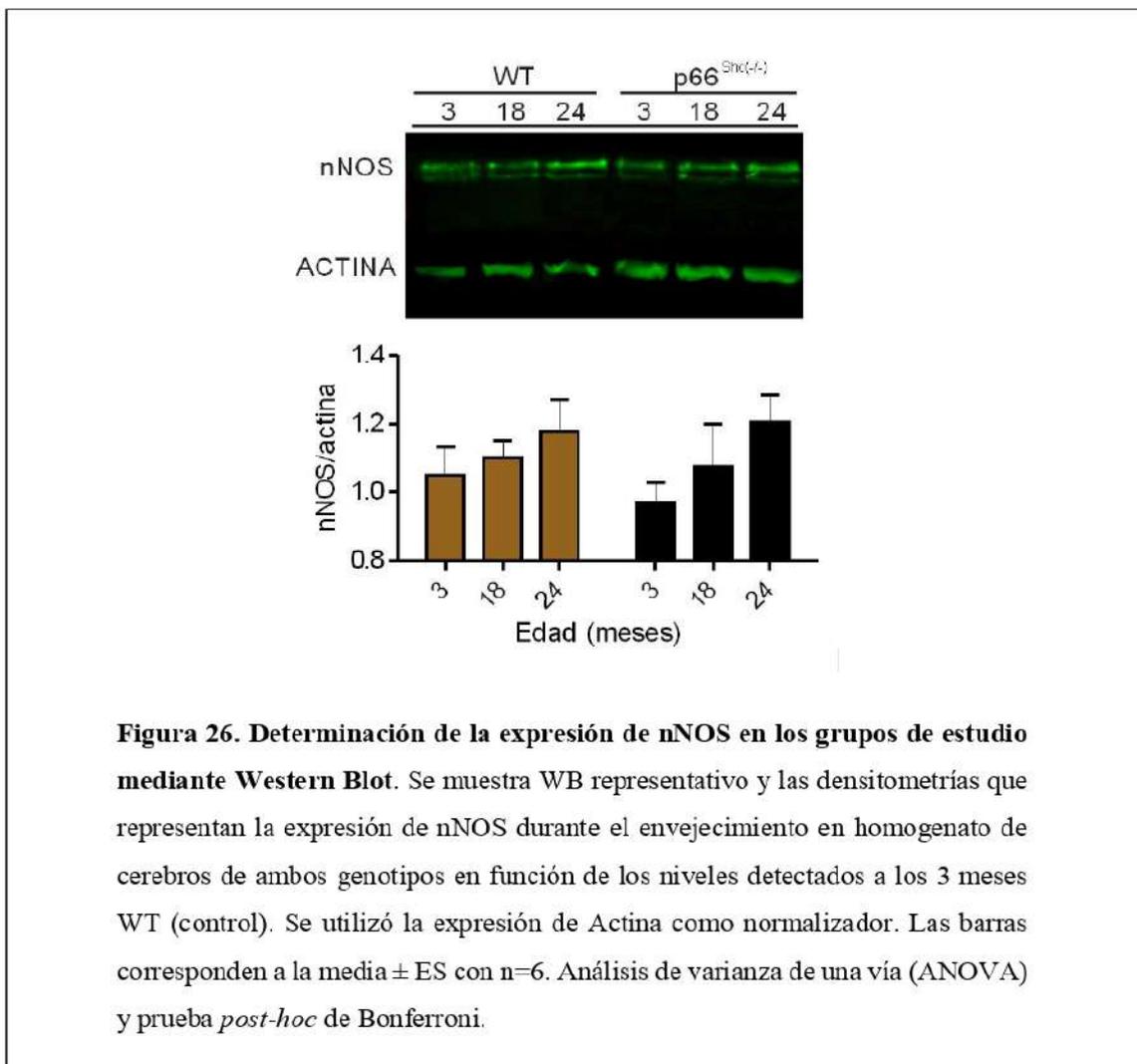
Figura 24. Determinación del contenido de ARNm de Catalasa mediante Real Time qPCR. Histograma que representa los niveles de expresión de ARNm de catalasa durante el envejecimiento en tejido cerebral de ambos genotipos relativo a los niveles detectados en el grupo (control) 3 meses WT. Se utilizó el ARNm de GADPH como normalizador. Las barras corresponden a la media \pm ES con n=8. Análisis de varianza de una vía (ANOVA).

7.3 La actividad de nNOS y la producción de RNS están alteradas en el tejido nervioso de ratones p66^{shc(-/-)} longevos

A partir del papel clave que las RNS tienen en el proceso de envejecimiento y debido a que gran parte del aumento en la producción de H₂O₂ detectado en la vejez es NO-dependiente, era interesante estudiar cómo se modifican los niveles de nNOS, sus productos y subproductos durante el envejecimiento en mitocondrias de cerebros de ratones p66^{shc(-/-)}, las cuales ya vimos presentan bajos niveles de producción de ROS. Para esto, primero analizamos los niveles de NO producidos en mitocondrias del tejido neural de ambos grupos durante el envejecimiento mediante citometría de flujo con la sonda DAF-FM, un compuesto no fluorescente que reacciona con NO para formar un benzotriazol fluorescente. En este ensayo, observamos un aumento en la producción de NO a lo largo de la vida de los ratones, siendo significativo en los últimos estadios de vida (18 y 24 meses de edad); este aumento en el grupo de ratones p66^{shc(-/-)} es superior al observado en el de los WT (Figura 25).



La modulación de la nNOS puede funcionar como mecanismo adaptativo de control de las funciones mitocondriales a través de la producción de NO, regulando homeostasis mitocondrial y la formación de ROS. Se estudió tanto la expresión como la actividad de esta enzima para poder explicar el aumento en la biodisponibilidad de NO observado en los ratones $p66^{shc(-/-)}$ viejos. Mediante Real Time PCR y Western Blot, se observó que la ausencia de la proteína adaptadora p66shc no afecta el modulado de la transcripción ni la traducción de nNOS a lo largo de la vida de los ratones. Por WB determinamos que nNOS aumenta levemente durante el envejecimiento en ambos grupos (Figura 26). Este sutil aumento en la expresión se da en ambos genotipos cuando comparamos los ratones envejecidos de cada grupo con sus contrapartes jóvenes. Aunque apreciable, dicho aumento no es estadísticamente significativo. Un resultado similar se observa al analizar la expresión del gen de nNOS mediante Real time PCR (Figura 27).



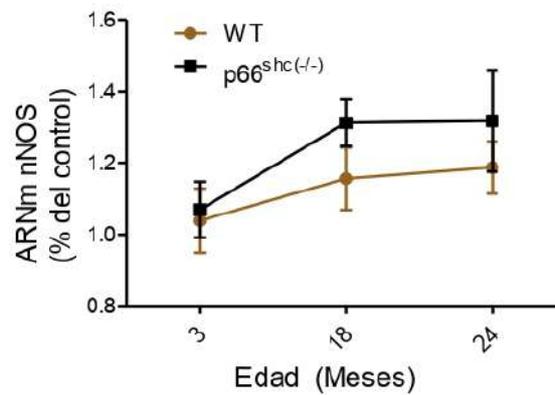


Figura 27. Determinación del contenido de ARNm de nNOS mediante Real Time qPCR. Histograma que representa los niveles de expresión de ARNm de nNOS durante el envejecimiento en tejido cerebral de ambos genotipos relativo a los niveles detectados en el grupo (control) 3 meses WT. Se utilizó el ARNm de GADPH como normalizador. Las barras corresponden a la media \pm ES con n=8. Análisis de varianza de una vía (ANOVA).

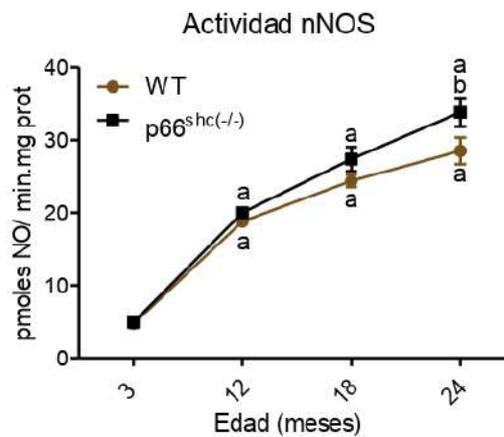


Figura 28. Determinación de la actividad enzimática de nNOS a partir del seguimiento de la reacción de conversión de [3H]-L-arginina a [3H]-L-citrulina. Histograma que representa la actividad de nNOS (pmoles NO/ min. mg proteína) en tejido cerebral de cada grupo durante el envejecimiento. Las barras corresponden a la media \pm ES con n=5 (a) $p < 0,05$ vs control 3 meses, (b) $p < 0,05$ vs grupo WT de la misma edad. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba *post-hoc*.

Resultados

En cambio, si nos concentramos en los últimos estadios de vida, a través del ensayo de conversión de [3H]-L-arginina a [3H]-L-citrulina, pudimos encontrar un aumento significativo de la actividad de nNOS en los animales p66^{shc(-/-)} en comparación con los WT ($p < 0,05$) (Figura 28). El incremento en la actividad de nNOS registrado a los 24 meses de edad en los ratones p66^{shc(-/-)} condice con la mayor producción y biodisponibilidad de NO detectados en el mismo período.

Sin embargo, sorprendentemente los ratones del grupo longevo p66^{shc(-/-)} no presentan el mismo perfil de nitración de proteínas mitocondriales que el observado en los animales WT en la vejez. En dichos animales se observa un marcado aumento en la cantidad de proteínas nitradas mientras que este aumento es notoriamente más sutil en el grupo KO cuando analizamos los Western Blot de proteínas mitocondriales expuestas a un anticuerpo específico anti 3-NO₂-Tirosina (Figura 29). Este curioso efecto podría deberse a la menor producción de O₂^{•-} detectado en los ratones p66^{shc(-/-)} gerontes. En este contexto, el superóxido sería rápidamente dismutado a H₂O₂ inhibiendo la formación de ONOO⁻ y desfavoreciendo la nitración de proteínas.

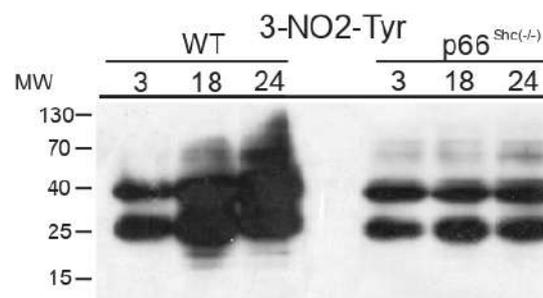


Figura 29. Determinación de proteínas mitocondriales nitradas. WB representativo de proteínas nitradas de mitocondrias de cerebro de ambos genotipos durante el envejecimiento; las membranas se revelaron con anticuerpos anti-3-nitrotirosina para cada grupo $n=3$.

7.4 Los cambios en el balance ROS/RNS durante el envejecimiento del tejido nervioso de ratones p66^{shc(-/-)} modifican parámetros metabólicos mitocondriales

Con el objetivo de comprender el efecto en la función mitocondrial producido por el desequilibrio de las ROS/RNS observado en los ratones p66^{shc(-/-)} durante el envejecimiento, era interesante determinar la velocidad del consumo de oxígeno mitocondrial. Para esto, se utilizaron, en un ensayo polarográfico con un electrodo de Clark, mitocondrias aisladas y purificadas de cerebro de ambos grupos con la adición de sustratos oxidables por el Complejo I (Malato/Glutamato) o por el Complejo II (Succinato). La velocidad de consumo de O₂ en ausencia de ADP nos permite determinar el estado 4, mientras que la velocidad en estado 3 se determinó a partir del agregado del mismo. Además se calculó el control respiratorio, que es el cociente entre el consumo de O₂ en estado 3/estado 4. Este valor adimensional, usualmente entre 3 y 8, indica el papel del ADP en la regulación del consumo de O₂ mitocondrial y provee un índice sensible para medir el grado de acoplamiento y la integridad de la membranas interna de las mitocondrias aisladas. En la Tabla 3 observamos cómo el envejecimiento afecta la velocidad de consumo de oxígeno disminuyéndola un 25% en el estado 3 de mitocondrias energizadas con ambos sustratos. Sin embargo, usando Malato-Glutamato como sustratos, la velocidad de consumo de O₂ en estado 3 de la cadena respiratoria en los ratones KO viejos se encuentra aumentada 22% y 68% con respecto al grupo WT de 3 y 24 meses, respectivamente (p<0,05). El efecto es menor al usar Succinato como sustrato, en donde no se observan diferencias entre el grupo control aunque se observa un aumento del 30% dentro el grupo KO y el WT de 24 meses (p <0,05).

Tabla 3. Consumo de oxígeno de mitocondrias de cerebro de ratones WT y p66^{Shc(-/-)}

	Control (WT 3m)	WT 24m	p66 ^{Shc(-/-)} 24m
Velocidad de consumo de O ₂			
1. Malato + Glutamato			
Estado 3 (ng-at O/min/mg proteína)	102 ± 3	74 ± 2 ^a	125 ± 4 ^{a,b}
Control Respiratorio (CCR)	4,3 ± 0,2	3,3 ± 0,1 ^a	4,4 ± 0,2 ^b
2. Succinato			
Estado 3 (ng-at O/min/mg proteína)	116 ± 4,4	84 ± 3,5 ^a	109 ± 5 ^b
Control Respiratorio (CCR)	4,1 ± 0,1	3,1 ± 0,1 ^a	5 ± 0,1 ^{a,b}

Nota: Los valores se expresan como la media ± ES de los diferentes grupos(n=6). Los resultados fueron contrastados en pares entre el grupo control de 3 meses de edad WT y los dos grupos longevos (^a). Así como los grupos de 24 meses de edad WT y p66^{Shc(-/-)} entre sí (^b). ^a and ^b representan p<0,05, Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba *post-hoc* de Bonferroni.

Los coeficientes de control respiratorio, usando tanto Mal/Glut como Succinato, presentaron una disminución del 30% en mitocondrias de grupos gerontes (p <0,05). Por su parte, los ratones KO de 24 meses de edad mantienen valores de CCR similares a los animales WT de 3 meses de edad (Tabla 3). Estos datos sugirieron un efecto inhibitorio de p66shc sobre la cadena respiratoria en el cerebro de ratones WT envejecidos.

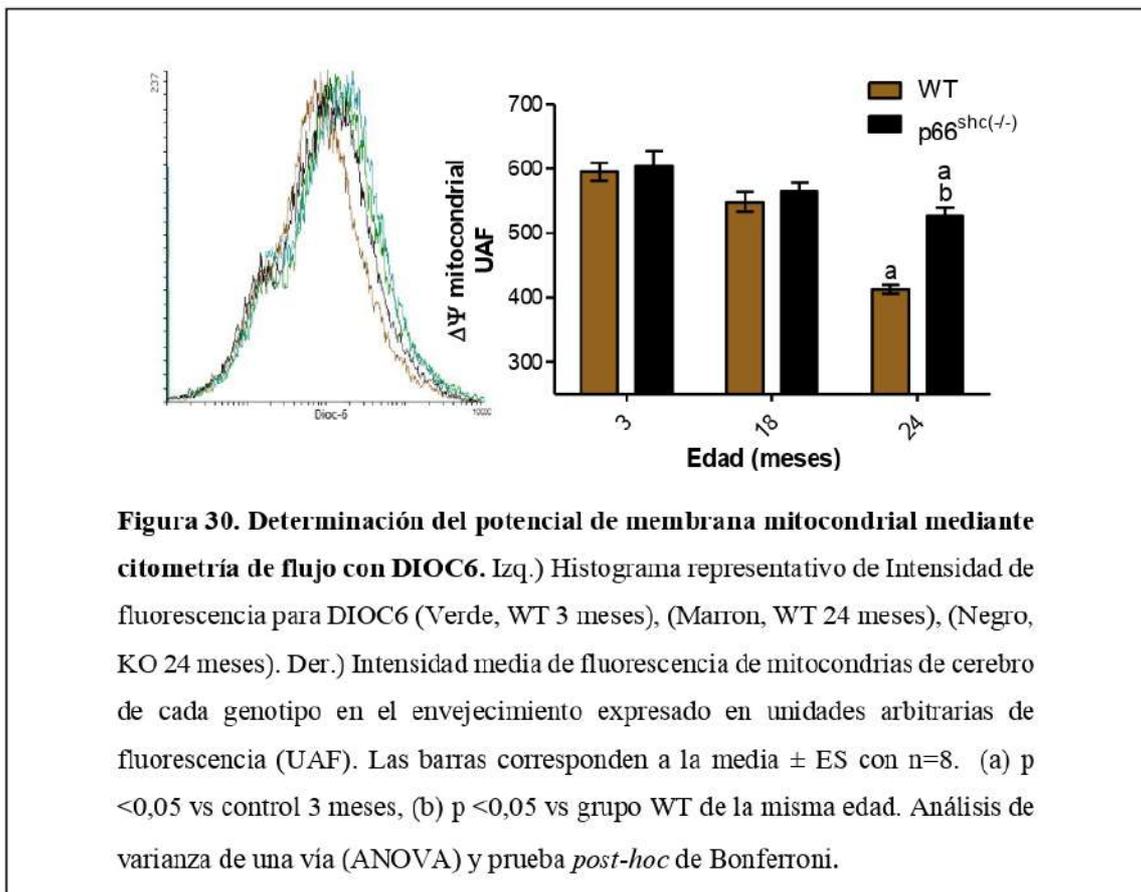
Para profundizar en la caracterización del estado metabólico del modelo se determinó el contenido de ATP del tejido nervioso en ambos grupos durante el envejecimiento mediante un método quimioluminiscente de oxidación de oxiluciferina. Mediante el mismo se detectó una disminución del 65% en el contenido de ATP en el grupo WT durante el envejecimiento (p <0,05). Este efecto se revirtió parcialmente en ratones p66^{Shc(-/-)}. En los ratones de 24 meses de este genotipo se observó una disminución de solo 35% en la producción de ATP en comparación con los ratones de 3 meses control (p <0,05) (Tabla 4). Esto sugiere que en el envejecimiento existen alteraciones en el acoplamiento entre la respiración y la generación de ATP, el cual disminuye sensiblemente en cerebros de ratones de ambos genotipos.

Tabla 4. Producción de ATP

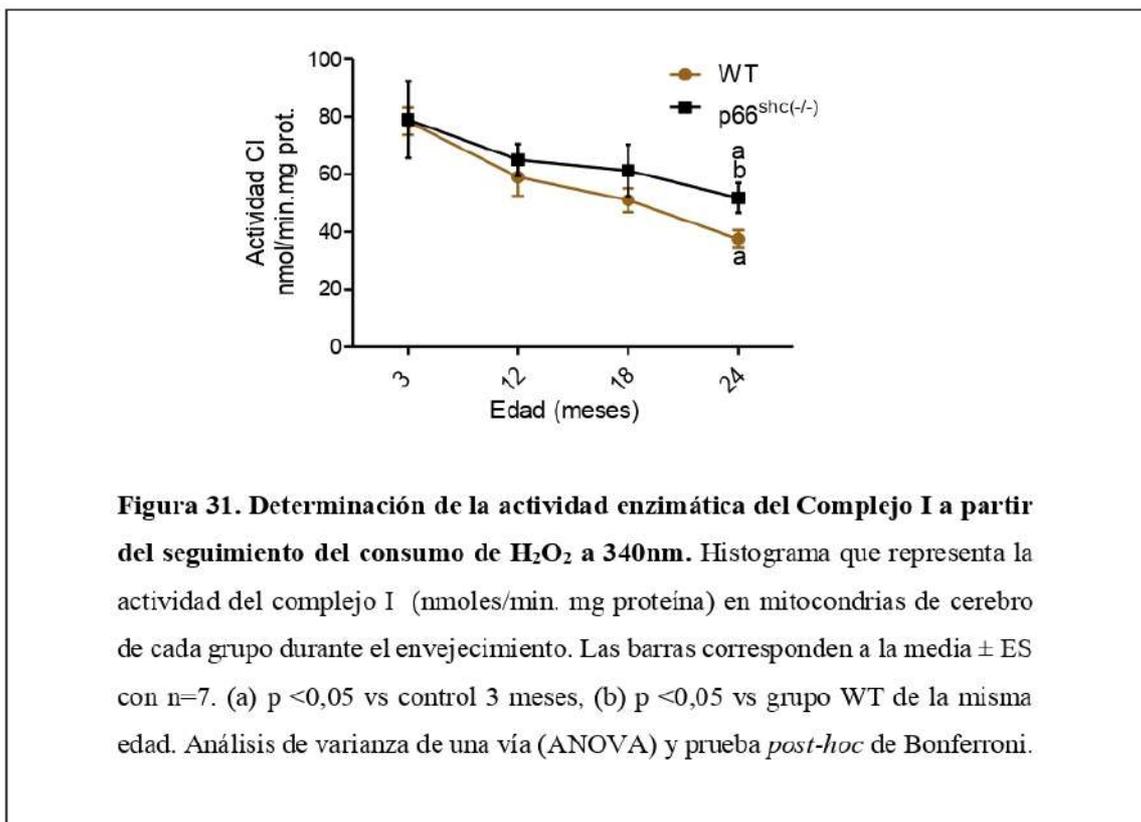
	Control (WT 3m)	WT 24m	p66 ^{shc(-/-)} 24m
ATP (nmol/mg proteína)	125 ± 1	42 ± 3 ^a	81 ± 2 ^{a,b}

Nota: Los valores son expresados como la media ± ES de los diferentes grupos (n=6). Los resultados fueron contrastados en pares entre el grupo control de 3 meses de edad WT y los dos grupos longevos (^a). Así como los grupos de 24 meses de edad WT y p66^{shc(-/-)} entre sí (^b). ^a and ^b representan p<0,05, Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba *post-hoc* de Bonferroni.

La fuerza protón motriz que impulsa la síntesis de ATP se produce por la diferencia de concentración de H⁺ que se forma a cada lado de la membrana interna mitocondrial. La determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) se llevó a cabo mediante citometría de flujo, utilizando una sonda potenciométrica (DIOC6) que se acumula en la matriz mitocondrial. Los resultados muestran que el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) decae con la edad observándose una disminución del 49% en ratones WT de 24 meses en comparación con sus contrapartes jóvenes (p <0,05). En cambio, este fenotipo es parcialmente revertido en ratones gerontes p66^{shc(-/-)} en donde se observó solo un 14 % de disminución del $\Delta\Psi$ observado en el grupo control (p <0,05) (Figura 30).



Para poder explicar la mejora en los parámetros bioenergéticos observados en el grupo *knock-out* durante el envejecimiento, es necesario comprender a qué nivel de la fosforilación oxidativa se encuentran las alteraciones detectadas en su función. A partir de ensayos espectrofotométricos, se estudió la actividad enzimática máxima de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. Los resultados mostraron que los ratones WT de 24 meses sufren una disminución más acentuada en la actividad del complejo I (CI) (-48%) que los ratones $p66^{shc(-/-)}$ envejecidos (-34%) en comparación con el grupo de control WT de 3 meses de edad ($p < 0,05$) (Figura 31). La disminución en la actividad de CI solo es detectable entre los grupos de animales más viejos, no encontrándose diferencias entre los genotipos en estadios de envejecimiento previos. Posiblemente, esto se deba en alguna medida a la nitración irreversible que sufre este complejo frente a altas concentraciones de $ONOO^-$. Al contrario de lo observado en el CI, se observó por espectrofotometría a 550nm una mayor inhibición en la actividad del CIV en el grupo *knock-out* durante el envejecimiento (-31%) en comparación con la disminución en la actividad observada en el grupo WT (-17%) ($p < 0,05$) (Figura 32). La mayor biodisponibilidad de NO detectada en mitocondrias de cerebro de ratones $p66^{shc(-/-)}$ envejecidos podría ser en parte responsable de la mayor inhibición (reversible) observada en la actividad de este complejo.



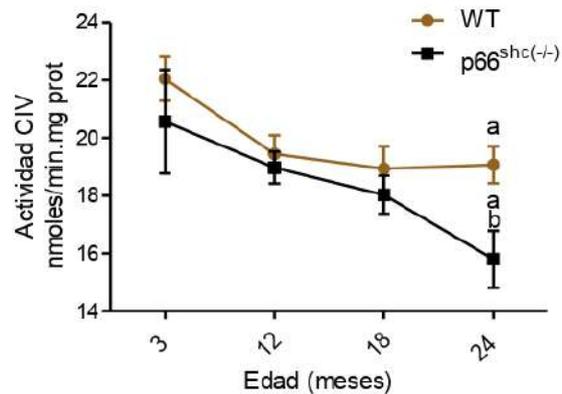


Figura 32. Determinación de la actividad enzimática del Complejo IV a partir del seguimiento del consumo de citocromo *c* reducido a 550nm. Histograma que representa la actividad del complejo IV (nmoles/min. mg proteína) en mitocondrias de cerebro de cada grupo durante el envejecimiento. Las barras corresponden a la media \pm ES con $n=7$. (a) $p < 0,05$ vs control 3 meses, (b) $p < 0,05$ vs grupo WT de la misma edad. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba *post-hoc* de Bonferroni

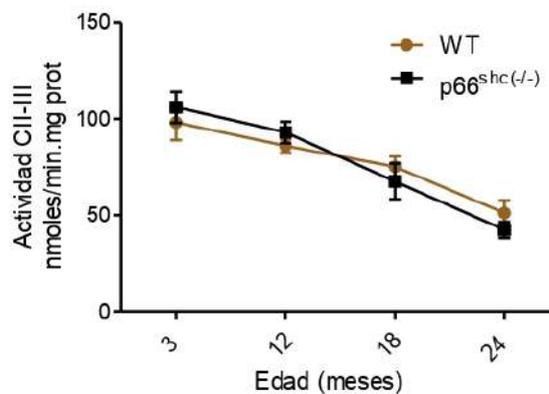


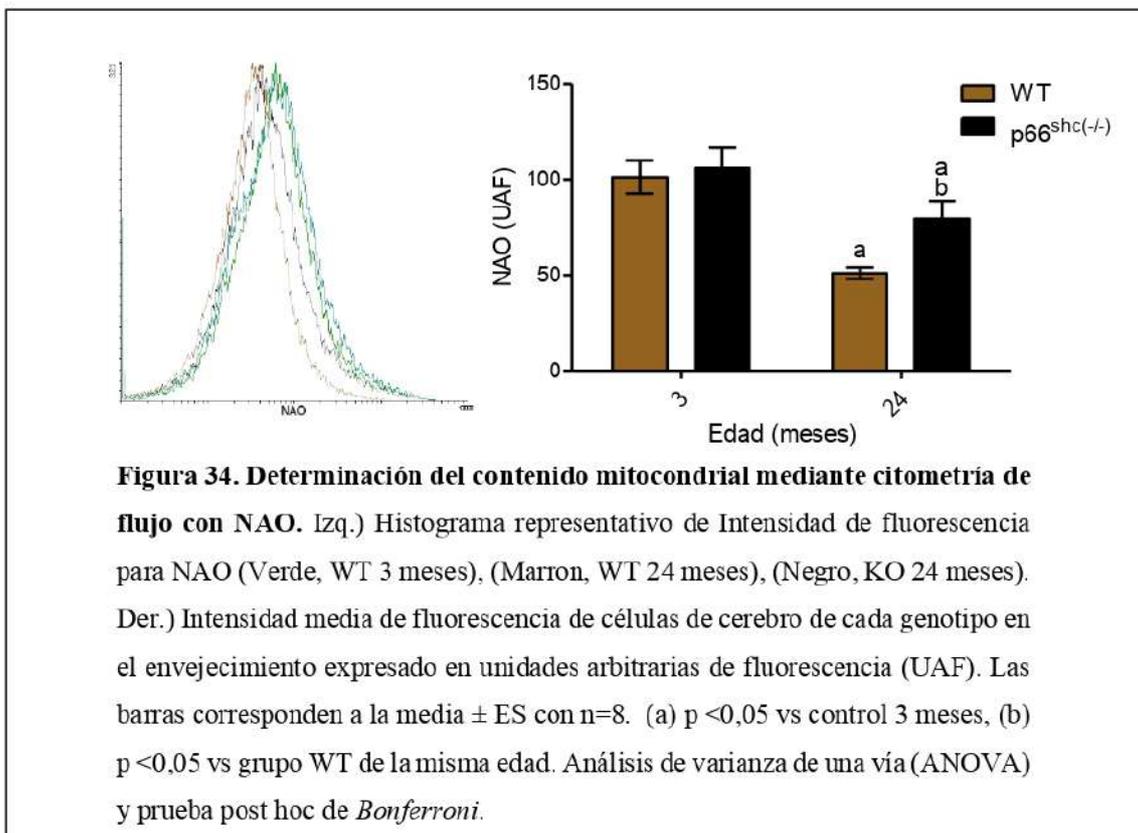
Figura 33. Determinación de la actividad enzimática del Complejo II-III a partir del seguimiento de formación de citocromo *c* reducido a 550nm. Histograma que representa la actividad del complejo III (nmoles/min. mg proteína) en mitocondrias de cerebros de cada grupo durante el envejecimiento. Las barras corresponden a la media \pm ES con $n=7$. Análisis de varianza de una vía (ANOVA).

No se observaron diferencias en los perfiles de actividad de CII-III entre ambos genotipos evaluados durante el envejecimiento (Figura 33). Tomados en conjunto, todos estos resultados indican que los ratones p66^{shc(-/-)} muestran una mejor condición en la función mitocondrial en el envejecimiento en comparación con los ratones del grupo WT.

7.5 La biomasa mitocondrial, la morfología y la ultraestructura se modifican en el envejecimiento del tejido nervioso de ratones $p66^{shc(-/-)}$

En base a la mejora de los parámetros bioenergéticos observada en ratones longevos $p66^{shc(-/-)}$ y debido a que varios autores informan sobre la disminución de la biogénesis mitocondrial durante el envejecimiento, era interesante estudiar cómo impacta la ausencia de $p66^{shc}$ en el contenido y la estructura mitocondrial. El contenido mitocondrial de una muestra puede ser determinado utilizando diferentes métodos que proporcionan información sobre la biogénesis y la capacidad oxidativa del tejido.

Como una medida de la masa mitocondrial, utilizamos 10-nonil bromil naranja de acridina (NAO, Invitrogen), un colorante metacrómico con fluorescencia a 533nm. El NAO se une a la cardiolipina, un fosfolípido específicamente presente en la membrana mitocondrial. Es importante destacar que la unión es independiente de $\Delta\Psi_m$ en el rango fisiológicamente relevante. El ensayo de citometría de flujo con células de tejido neural teñidas con NAO mostró una disminución en la intensidad de fluorescencia de un 46% en el grupo WT durante el envejecimiento mientras que esta reducción en la masa mitocondrial es menor en el grupo $p66^{shc(-/-)}$ (27%) (Figura 34).



La condensación del oxaloacetato dicarboxilato y acetil CoA a citrato tricarboxilato es catalizada por la citrato sintasa. A partir de esta reacción las moléculas, como acetil CoA obtenidos a partir de la oxidación de piruvato, se introducen en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA o Ciclo de Krebs). Como una enzima mitocondrial, la citrato sintasa es utilizada comúnmente como un factor de normalización para la cuantificación de proteína mitocondrial, pero también es posible utilizarla como biomarcador para el contenido mitocondrial en un homogeneizado de tejido. Este ensayo mide la producción de coenzima A (SH-CoA) mediante el monitoreo de la reacción con la citrato sintasa a 412 nm. Mediante esta técnica, al igual que con NAO, se detectó una disminución del contenido mitocondrial en el envejecimiento, aunque en este caso fue de tan solo un 25% y no se observaron efectos entre los genotipos estudiados (Figura 35).

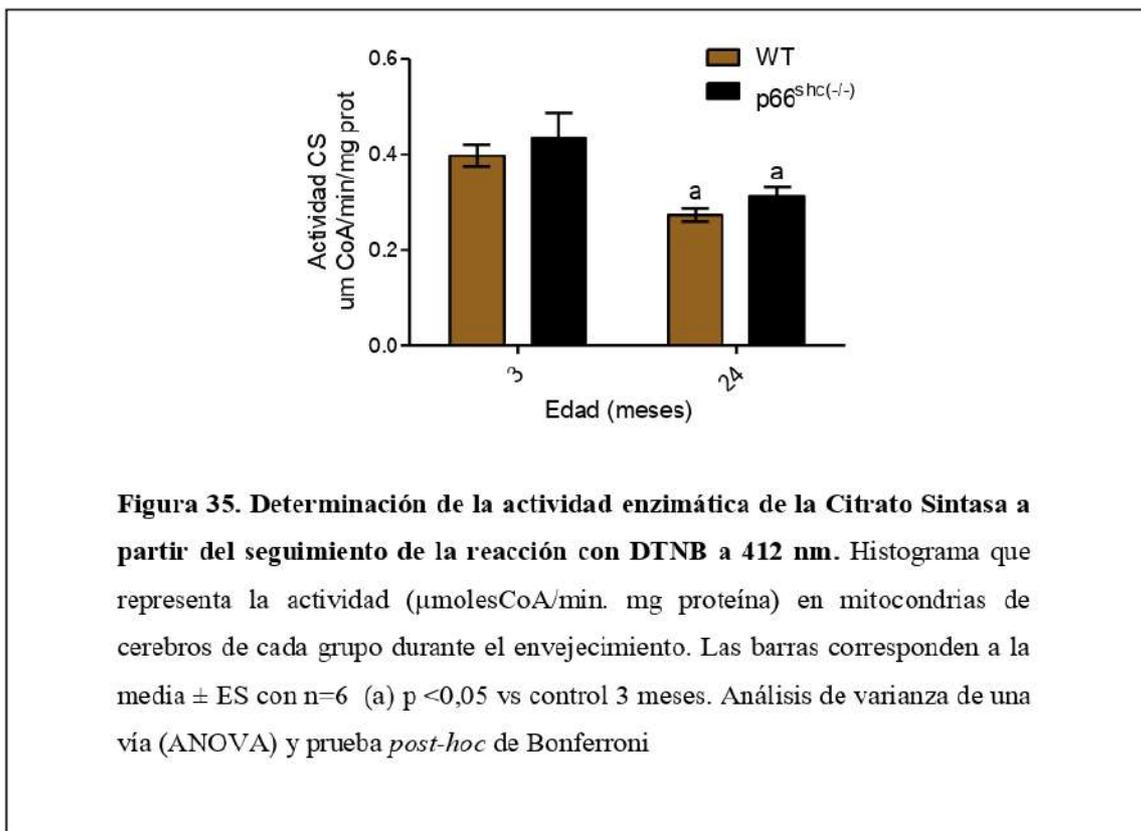


Figura 35. Determinación de la actividad enzimática de la Citrato Sintasa a partir del seguimiento de la reacción con DTNB a 412 nm. Histograma que representa la actividad ($\mu\text{molesCoA}/\text{min. mg proteína}$) en mitocondrias de cerebros de cada grupo durante el envejecimiento. Las barras corresponden a la media \pm ES con $n=6$ (a) $p < 0,05$ vs control 3 meses. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba *post-hoc* de Bonferroni

Resultados

Por último, se determinó mediante Real Time PCR con primers específicos, el contenido de ADN mitocondrial (ADNmt) relativo al ADN nuclear (ADNn) en homogenatos de cerebro de los grupos de estudio. Los resultados se presentaron como un porcentaje del contenido relativo de ADNmt/ADNn de ratones control de 3 meses de edad. En la Figura 36, se observa algo similar a lo obtenido por los anteriores métodos. Durante el envejecimiento, el contenido relativo de ADNmt se redujo un 30% en el grupo WT, mientras que en el grupo $p66^{shc(-/-)}$ se observó un aumento de hasta 45% en comparación con el grupo control ($p < 0,05$). Si analizamos los 2 grupos envejecidos entre sí, se detectó un aumento del 75% en el contenido relativo de ADNmt en ratones $p66^{shc(-/-)}$ de 24 meses ($p < 0,05$).

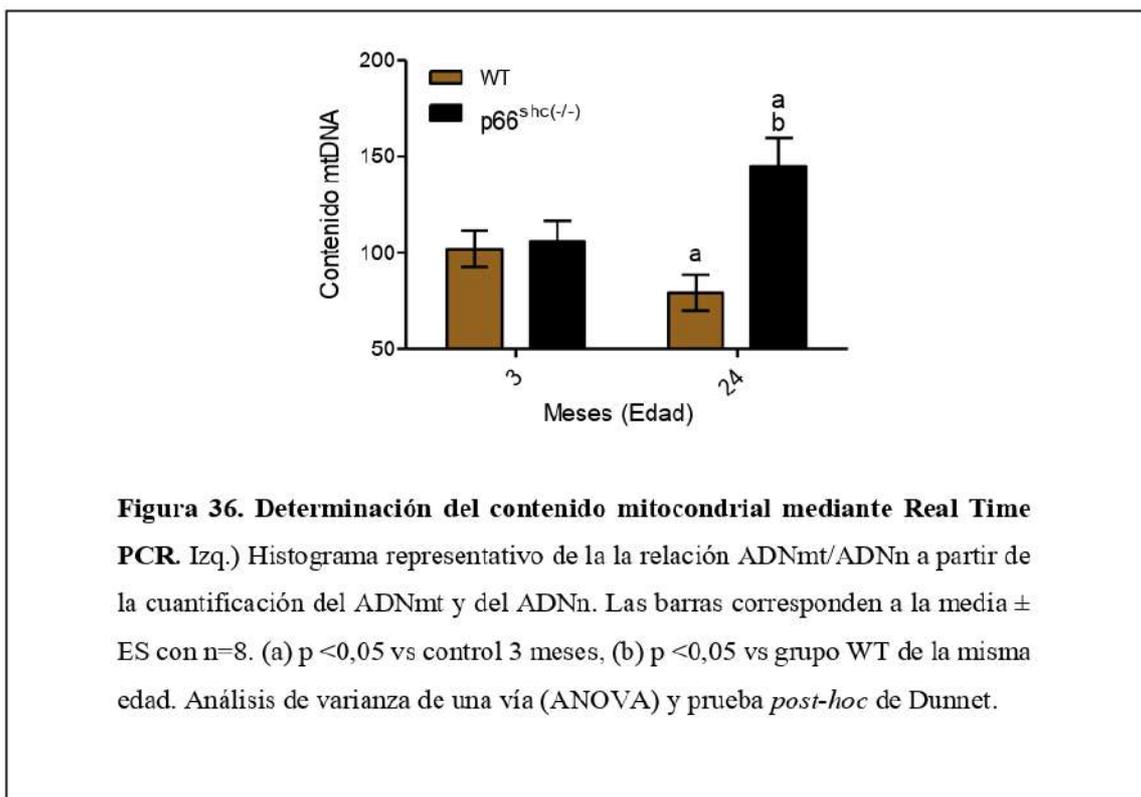


Figura 36. Determinación del contenido mitocondrial mediante Real Time PCR. Izq.) Histograma representativo de la relación ADNmt/ADNn a partir de la cuantificación del ADNmt y del ADNn. Las barras corresponden a la media \pm ES con $n=8$. (a) $p < 0,05$ vs control 3 meses, (b) $p < 0,05$ vs grupo WT de la misma edad. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba *post-hoc* de Dunnet.

De acuerdo con estos resultados, decidimos analizar el nivel de expresión del ARNm de PGC-1 α , factor de transcripción encargado de promover la biogénesis mitocondrial. Mediante Real Time PCR pudimos observar que el contenido de PGC-1 α disminuyó 50% en homogenatos de tejido neural de ratones WT durante el envejecimiento mientras que en el grupo $p66^{shc(-/-)}$, PGC-1 α permaneció estable a lo largo de toda la vida de los ratones ($p < 0,05$) (Figura 37).

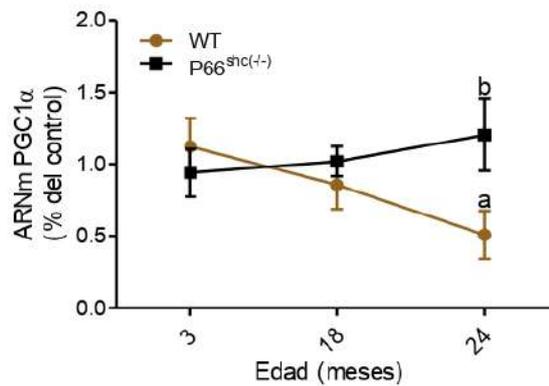
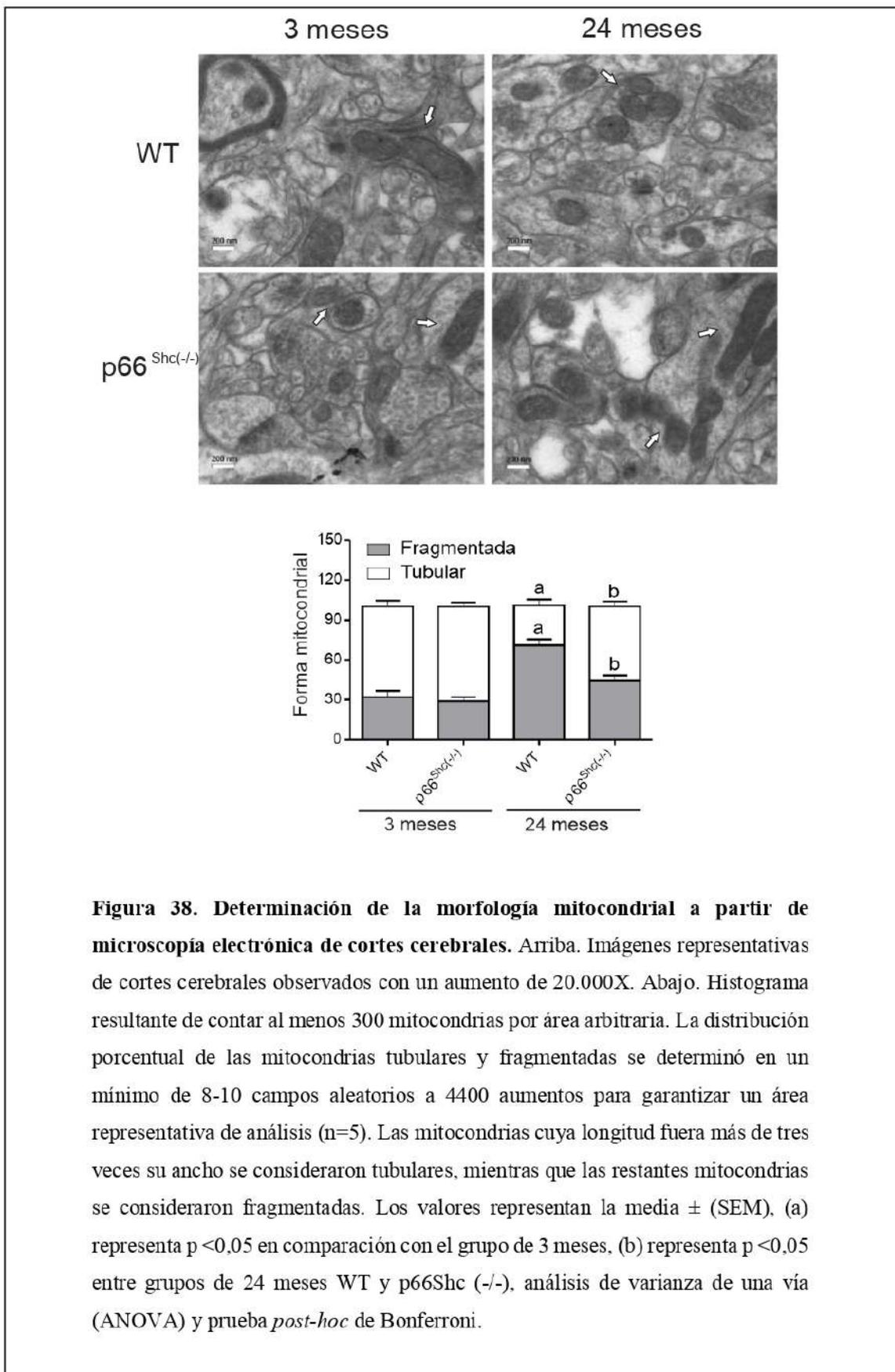


Figura 37. Determinación del contenido de ARNm de PGC-1 α mediante Real Time qPCR. Histograma que representa los niveles de expresión de ARNm de PGC-1 α durante el envejecimiento en tejido cerebral de ambos genotipos relativo a los niveles detectados en el grupo (control) 3 meses WT. Se utilizó el ARNm de GADPH como normalizador. Las barras corresponden a la media \pm ES con n=8. (a) $p < 0,05$ vs control 3 meses, (b) $p < 0,05$ vs grupo WT de la misma edad. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba *post-hoc* de Dunnet.

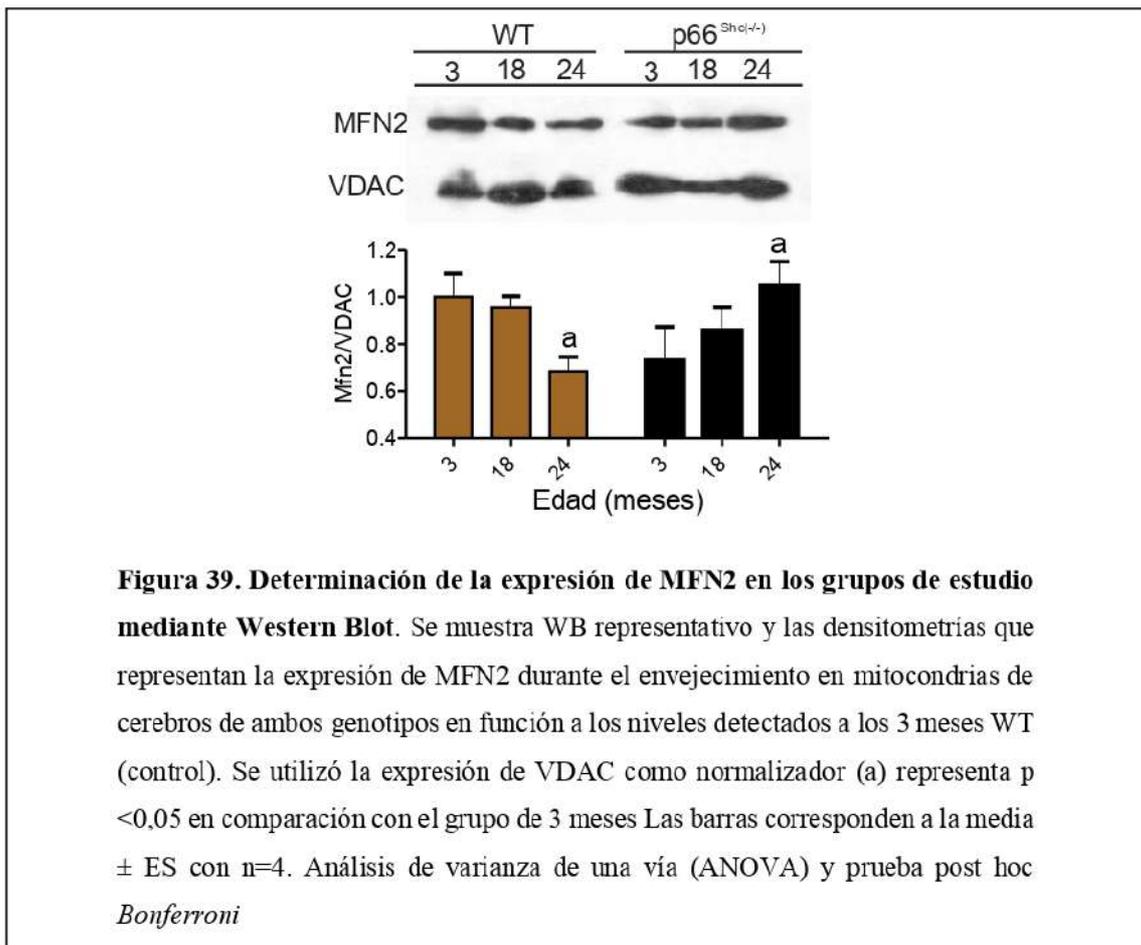
Imágenes de microscopio electrónico a partir de cortes de cerebro fresco mostraron diferencias en la morfología mitocondrial. En ratones WT y p66^{shc(-/-)} de 3 meses de edad, se observaron mitocondrias de tamaño y volumen normales, siendo predominantemente mitocondrias que adoptan formas filamentosas o tubulares (70% de las mitocondrias totales medidas) mientras que el resto mostró una morfología circular (fragmentada) (Figura 26). Sin embargo, hacia el final de la vida, tiempo de producción máxima de ROS, observamos una disminución en la cantidad de mitocondrias tubulares (-44%) y un aumento considerable de mitocondrias fragmentadas (+120%) en cortes de cerebro de ratones WT de 24 meses ($p < 0,05$). Dicho efecto se revierte parcialmente cuando analizamos las mitocondrias de los cortes de cerebro de ratones de p66^{shc(-/-)} de 24 meses de edad. En estos se observan ambos tipos de poblaciones mitocondriales, un fenotipo intermedio entre lo observado en los ratones WT de 3 y 24 meses con (55% de mitocondrias tubulares) (Figura 38).



7.6 La ausencia de p66shc altera la homeostasis de la dinámica mitocondrial en el envejecimiento

La morfología mitocondrial depende de la interacción entre procesos altamente dinámicos, como la fusión, fisión y el equilibrio entre ambas. Para comprender cómo interviene p66shc en la dinámica mitocondrial, analizamos los cambios en la expresión y transcripción de algunas de las principales proteínas responsables del redimensionamiento de la red mitocondrial.

Mediante Western Blot y Real Time PCR observamos que en ratones WT el contenido de proteína de fusión Mfn2 en la fracción mitocondrial disminuye con el envejecimiento (30%), Mientras que en los ratones p66^{shc(-/-)} se detectó un aumento del 25% en los niveles de esta proteína ($p < 0,05$) (Figura 39). A su vez, los niveles de ARNm de Mfn2 durante el envejecimiento se mantuvieron constantes en el grupo WT mientras que el grupo KO presentó una tendencia ascendente a lo largo de toda la vida que se volvió significativa en el grupo de 24 meses ($p < 0,05$) (Figura 40).



OPA1, la otra proteína de fusión analizada por Western Blot y Real Time PCR, no registró diferencias en los niveles de expresión ni en su expresión de mensajero (Figura 41 y 42).

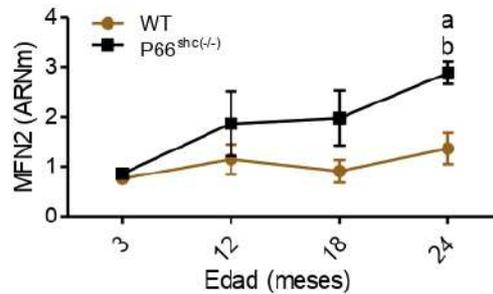


Figura 40. Determinación del contenido de MFN2 mediante Real Time qPCR. Histograma que representa los niveles de expresión de ARNm de MFN2 durante el envejecimiento en tejido cerebral de ambos genotipos relativo a los niveles detectados en el grupo (control) 3 meses WT. Se utilizó el ARNm de GADPH como normalizador. Las barras corresponden a la media \pm ES con $n=8$. (a) $p < 0,05$ vs control 3 meses, (b) $p < 0,05$ vs grupo WT de la misma edad. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba *post-hoc* de Dunnet

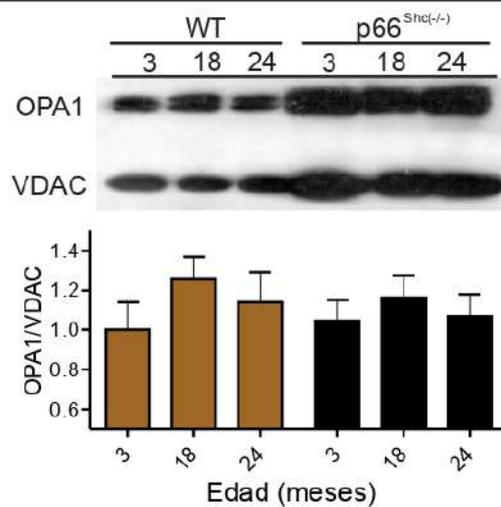


Figura 41. Determinación de la expresión de OPA1 en los grupos de estudio mediante Western Blot. Se muestra WB representativo y las densitometrías que representan la expresión de MFN2 durante el envejecimiento en mitocondrias de cerebro de ambos genotipos en función a los niveles detectados a los 3 meses WT (control). Se utilizó la expresión de VDAC como normalizador. Las barras corresponden a la media \pm ES con $n=4$. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba *post-hoc* de Bonferroni

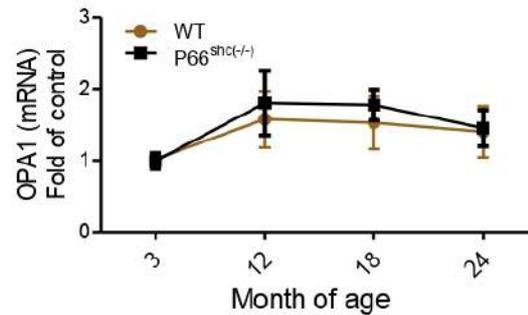
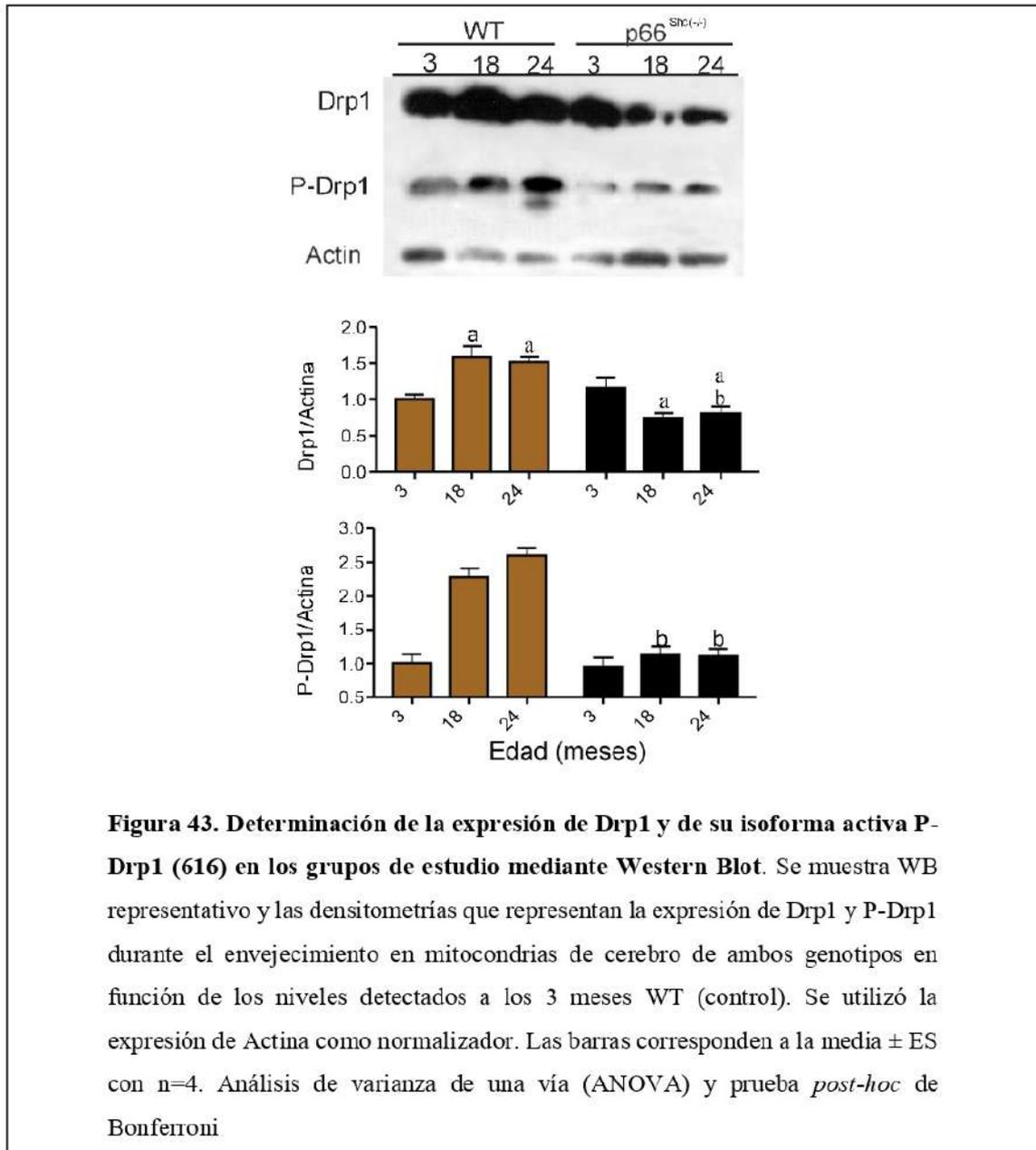


Figura 42. Determinación del contenido de OPA1 mediante Real Time qPCR.

Histograma que representa los niveles de expresión de ARNm de MFN2 durante el envejecimiento en tejido cerebral de ambos genotipos relativo a los niveles detectados en el grupo (control) 3 meses WT. Se utilizó el ARNm de GADPH como normalizador. Las barras corresponden a la media \pm ES con $n=8$. (a) $p < 0,05$ vs control 3 meses, (b) $p < 0,05$ vs grupo WT de la misma edad. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba *post-hoc* de Dunnet

Para profundizar en la comprensión del efecto de p66shc sobre la red mitocondrial, estudiamos en homogenatos de cerebro de ambos grupos a lo largo del envejecimiento los patrones de expresión y contenido de ARNm de Drp1 o también conocido como DNML1 (GTPasa de las superfamilia de las dinaminas). Esta proteína es la principal encargada del proceso de fisión mitocondrial. Mediante Western Blot detectamos un aumento de hasta el 50% en la expresión de esta proteína a lo largo del envejecimiento en el grupo de ratones WT, mientras que los ratones p66^{shc(-/-)} de 24 meses presentaron una disminución del 30% en la expresión de Drp1 en comparación con el grupo control de 3 meses ($p < 0,05$) (Figura 43).

Trabajos previos demostraron que la fosforilación en S616 de Drp1 estimula la fisión mitocondrial. En ratones WT se observó, por Western Blot, un aumento de 2,5 veces en los niveles de esta fosforilación a lo largo de la vida ($p < 0,05$). Sin embargo, no se detectaron cambios en los niveles de p-Drp1 (S616) en las muestras de cerebro de los ratones p66^{shc(-/-)} durante el envejecimiento (Figura 43). La expresión génica de Drp1 mostró el mismo patrón de modulación que el observado en la expresión proteica a lo largo de la vida de los ratones WT y p66^{shc(-/-)}; exhibiendo un aumento de hasta 3 veces en ratones WT de 24 meses y permaneciendo estables en p66^{shc(-/-)} grupo, como se muestra en la misma figura ($p < 0,05$) (Figura 44).



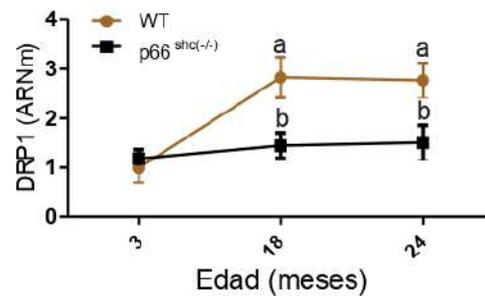


Figura 44. Determinación del contenido de DRP1 mediante Real Time qPCR. Histograma que representa los niveles de expresión de ARNm de DRP1 durante el envejecimiento en tejido cerebral de ambos genotipos relativo a los niveles detectados en el grupo (control) 3 meses WT. Se utilizó el ARNm de GAPDH como normalizador. Las barras corresponden a la media \pm ES con $n=8$. (a) $p < 0,05$ vs control 3 meses, (b) $p < 0,05$ vs grupo WT de la misma edad. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba *post-hoc* de Dunnet

7.7 La actividad de Sirt3 puede ser regulada a través de nitración por ONOO⁻

Para entender cómo los altos niveles de RNS, más precisamente ONOO⁻, pueden modular la capacidad de desacetilación del proteoma mitocondrial estudiamos la bioquímica de Sirt3. Esta proteína está descrita como la principal responsable de este proceso en mitocondrias y se la considera clave en el retraso de la pérdida de funciones biológicas durante el envejecimiento. La actividad biológica de estas desacetilasas depende de NAD⁺ como un cofactor.

La nicotinamida adenina dinucleótido tiene varias funciones esenciales en el metabolismo y además de ser sustrato para las sirtuinas, actúa como coenzima en varias reacciones redox. La relación NAD⁺/NADH es un parámetro bioenergético interesante de analizar capaz de ser detectado a través de un método colorimétrico. En dicho ensayo, mitocondrias purificadas de cerebros de ratones WT presentaron una fuerte reducción (78%) en la relación NAD⁺/NADH durante el envejecimiento. Mientras que en los ratones p66^{shc(-/-)}

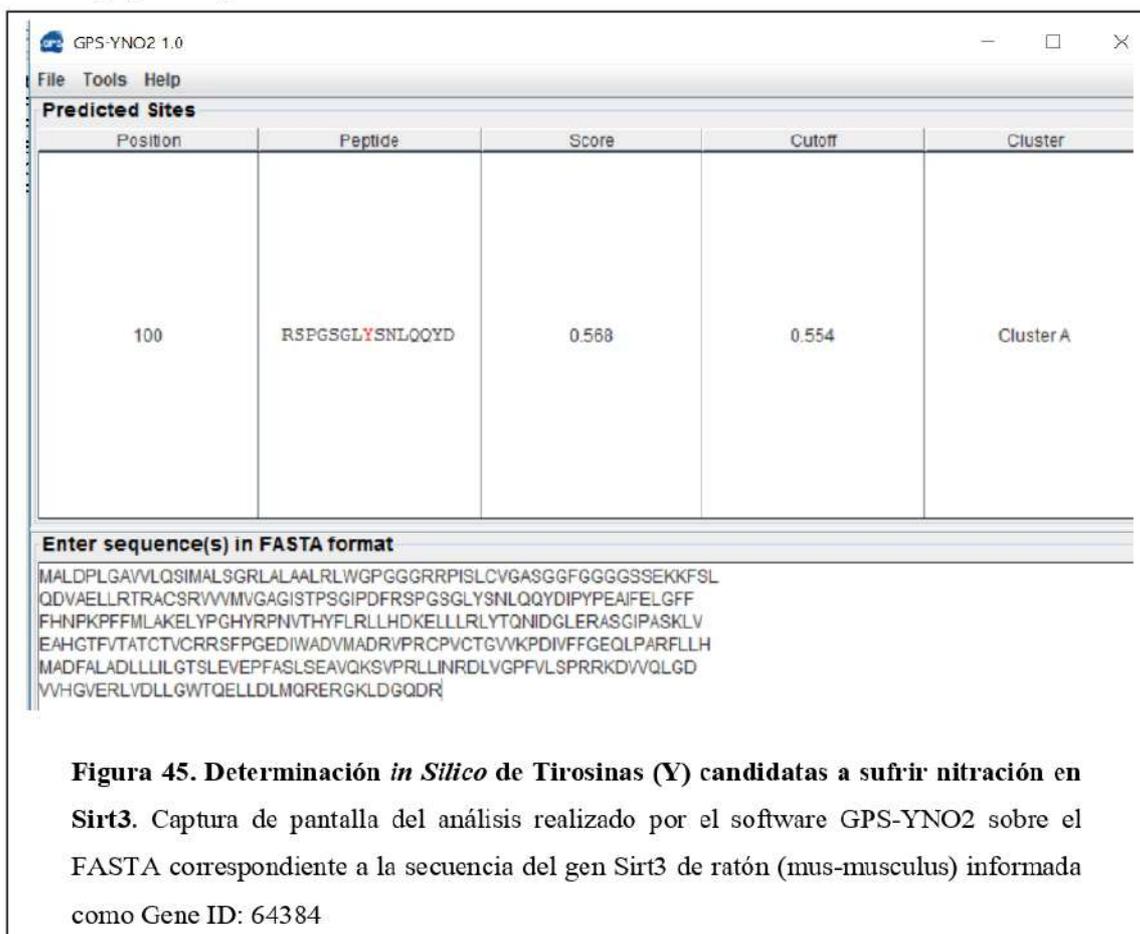
se observó una disminución leve (32%) en comparación con la observada en el grupo WT, dando cuenta de un ambiente con mayor biodisponibilidad de NAD⁺ (Tabla 5).

Tabla 5. Relación NAD/NADH.

	Control (WT 3m)	WT 24m	p66 ^{shc(-/-)} 24m
Relacion NAD/NADH	5,3 ± 0,7	1,2 ± 0,4 ^a	2,7 ± 0,5 ^{a,b}

Kit comercial colorimétrico donde los valores son expresados como la media ± Error estandar de los diferentes grupos (n=6). Los resultados fueron contrastados en pares entre el grupo control de 3 meses de edad WT y los dos grupos longevos (^a). Así como los grupos de 24 meses de edad WT y p66^{Shc(-/-)} entre sí (^b). ^a y ^b representan p<0,05 mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba *post-hoc* de Bonferroni. UAF: Unidades Arbitrarias de Fluorescencia.

Utilizando un software bioinformático GPS (Sistema de predicción basado en grupos) que nos permite predecir diferentes modificaciones postraduccionales, analizamos la secuencia aminoacídica murina de Sirt3 desacetilasa y detectamos una tirosina susceptible de ser nitrada en la posición 100. Dicha posición se ha informado como parte de un posible sitio de unión a NAD⁺ (Figura 45).



Mediante el uso de un kit comercial fluorométrico, analizamos si la actividad de Sirt3 era sensible a la nitración. Para esto, incubamos Sirt3 recombinante (rSirt3) con concentraciones crecientes de ONOO⁻ (100, 250 y 500 μM) y observamos una disminución en la actividad enzimática del 47%, 55% y 70%, respectivamente (p <0,05) (Figura 46).

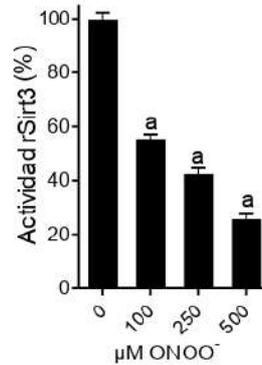
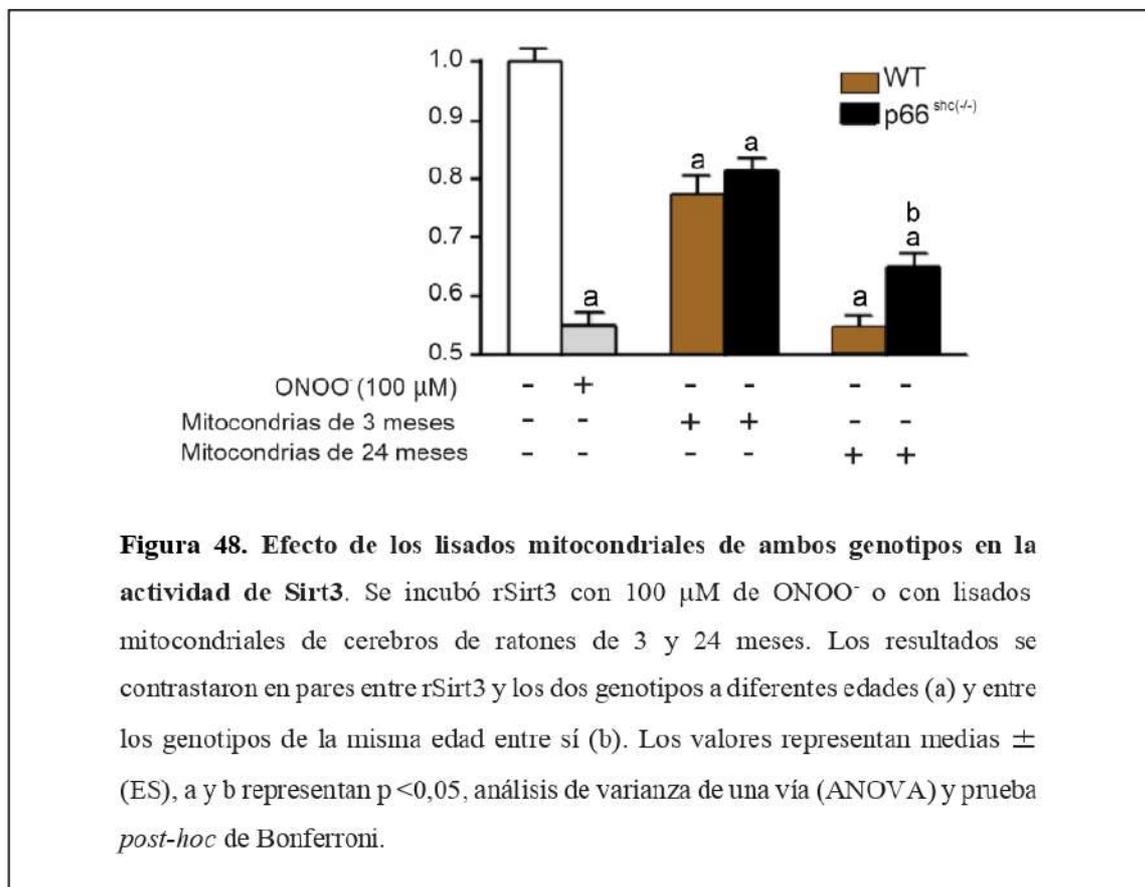
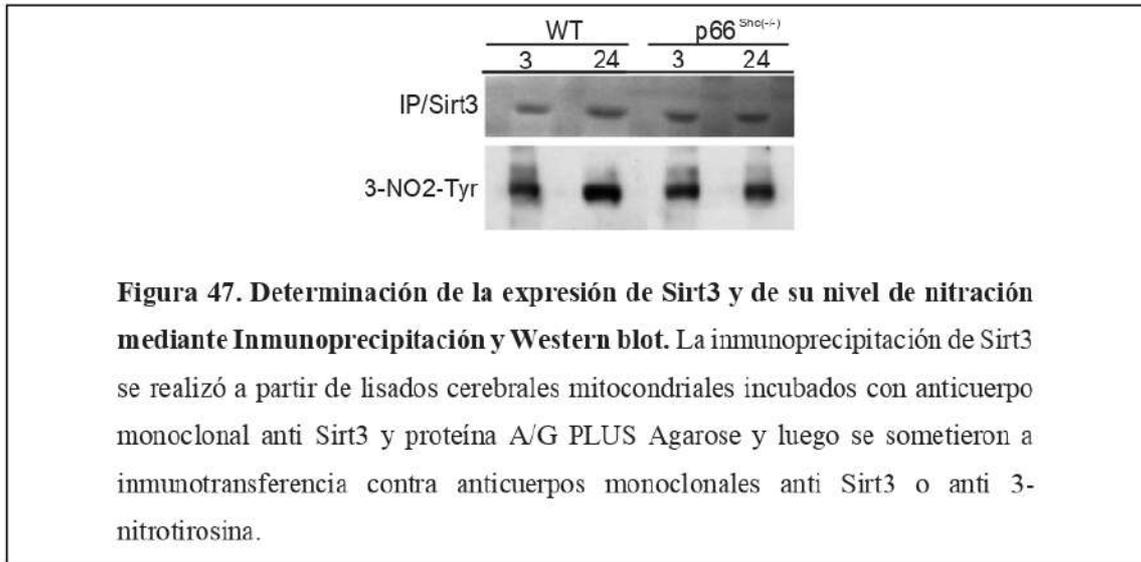


Figura 46. Efecto del ONOO⁻ en la actividad de Sirt3. La actividad de Sirt3 recombinante (rSirt3) se determinó mediante un método fluorométrico. Se incubó rSirt3 con concentraciones crecientes de ONOO⁻ (100, 250, 500 μM). Los resultados se contrastaron en pares a diferentes concentraciones de ONOO⁻ (a). Los valores representan medias ± (ES), a y b representan p <0,05, análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba *post-hoc* de Bonferroni

Este resultado nos llevó a preguntarnos si los altos niveles de ONOO⁻ observados en el envejecimiento eran capaces de modificar la expresión, la estructura y la actividad de la Sirt3. Para tratar de responder esta cuestión, inmunoprecipitamos la proteína incubando mitocondrias de cerebro purificadas de ambos grupos con anticuerpos anti-Sirt3. No se observaron diferencias relacionadas con la edad o el genotipo en los niveles de expresión de Sirt3 medidas a partir del WB del inmunoprecipitado (Figura 35). En cambio, si el inmunoprecipitado de Sirt3 es incubado con un anticuerpo anti 3-nitrotirosina, es posible observar que los animales WT de 24 meses presentan un aumento en la nitración que es indetectable en el grupo p66^{shc(-/-)} (Figura 47).

En concordancia con estos resultados, la actividad de la rSirt3 del kit de actividad expuesta a la fracción mitocondrial del cerebro de ratones p66^{shc(-/-)} de 24 meses fue mayor que la observada cuando se la incubó con la fracción mitocondrial de ratones WT gerontes (p <0,05). Este efecto inhibitorio observado con los extractos de los ratones WT de 24 fue equivalente al obtenido incubando rSirt3 con 100 μM de ONOO⁻. En cambio, mitocondrias de

ratones p66^{shc(-/-)} viejos, con elevada relación NAD⁺/NADH y bajo contenido de proteínas mitocondriales nitradas mostraron un ambiente favorable y menos inhibitorio para la actividad de rSirt3 que la observada en el grupo WT en el envejecimiento (33 %) (p <0,05) (Figura 48).



8 DISCUSIÓN.

La fragilidad cognitiva emerge como uno de los mayores desafíos para la medicina del siglo XXI. A medida que la expectativa de vida de la población aumenta, también lo hace la prevalencia del deterioro cognitivo, las enfermedades neurodegenerativas y la demencia, saturando y colapsando los sistemas sociales y de salud. Según la OMS, un gran porcentaje de los adultos mayores de 85 años sufren de Alzheimer, por lo que es fundamental comprender los mecanismos del deterioro cognitivo durante el envejecimiento. El desarrollo de este tipo de patologías debe entenderse en el contexto de la biología molecular del proceso de envejecimiento.

El envejecimiento es un proceso degenerativo multifactorial que afecta la endocrinología y la bioquímica del cerebro. La función mitocondrial disminuye en el proceso de envejecimiento normal aumentando la incidencia de trastornos neurodegenerativos relacionados con la edad. Los estudios de expresión génica sugieren que la reducción en la expresión de genes mitocondriales durante el envejecimiento es una característica fuertemente conservada en los organismos a lo largo de la evolución que incluye desde *Caenorhabditis elegans* hasta los humanos. En particular, análisis órgano-específicos han revelado una disminución progresiva en la expresión génica mitocondrial en cerebro de ratas, ratones, macacos rhesus y seres humanos durante el envejecimiento (Bishop D. B., 2010).

Muchas de las funciones fisiológicas de nuestro cuerpo son establecidas o controladas por nuestro cerebro. El cerebro es el órgano más complejo en el cuerpo humano. Es el centro de nuestro sistema nervioso y orquesta muchos procesos necesarios para el mantenimiento de la homeostasis y las acciones físicas. Comprender cómo envejece el cerebro humano e identificar los mecanismos por los que se desarrolla este proceso puede ser crucial para retrasar o revertir el envejecimiento saludable de todo el cuerpo. En el cerebro humano, el declive de la función mitocondrial puede afectar selectivamente a poblaciones neuronales con grandes demandas bioenergéticas, como las grandes neuronas piramidales que degeneran y conducen al Alzheimer. Por lo tanto, la disminución de la función mitocondrial puede contribuir al envejecimiento del cerebro y hacer que las neuronas sean vulnerables a las patologías dependientes de la edad. La función mitocondrial parece ser una importante influencia moduladora en el proceso de envejecimiento en todas las especies evaluadas, y puede, según el contexto, tener efectos tanto positivos como negativos en la esperanza de vida. Si bien los

mecanismos reales que subyacen a la extensión de la esperanza de vida en estos modelos experimentales no están del todo claros, una hipótesis es que la función eficiente de la cadena de transporte de electrones reduce la generación y liberación de especies reactivas de oxígeno dañinas para la célula.

Esta hipótesis está alineada con la teoría del envejecimiento por radicales libres, que atribuye este proceso al daño oxidativo causado por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) derivadas de la respiración mitocondrial cuando el O_2 se reduce parcialmente (Harman D., 1956). La formación de O_2^- depende de la concentración de potenciales dadores de electrones, la concentración local de O_2 y las constantes de velocidad de segundo orden para las reacciones entre ambos. Existen varios sitios para la formación de O_2^- a lo largo de la cadena respiratoria debido a la fuga de electrones durante su transferencia en la fosforilación oxidativa, siendo los complejos I y III los más ampliamente estudiados.

Aunque el complejo III parece ser responsable de la mayor parte del O_2^- producido en las mitocondrias de corazón y de pulmón (Turrens J. F. y Boveris A, 1980; Turrens J. F., 1982), el Complejo I parece ser la principal fuente de formación de O_2^- en el cerebro en condiciones normales (Barja G. y Herrero A. J., 1998; Barja G., 1999). Además, el complejo I es la principal fuente de ROS en una variedad de escenarios patológicos como el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas (Barja G, y Herrero A. J., 1998; Nicholls D. G., 2002; Trojanowski J. Q., 2003).

Los dos principales estados que inducen la producción significativa de O_2^- son: (i) cuando las mitocondrias no producen ATP con altos niveles de CoQ reducida y, en consecuencia, un Δp alto (fuerza protón-motriz); y (ii) cuando hay una baja proporción de NAD/NADH en la matriz mitocondrial. Ambos estados convergen en diferente magnitud durante el envejecimiento (Murphy M. P., 2009). Asimismo, el envejecimiento tiene también un impacto negativo en la biosíntesis de NAD limitando su biodisponibilidad en células humanas (Borradaile M. N., 2009; Koltai E., 2010) y murinas (Yoshino J., 2011). Este cofactor es esencial para el normal desempeño de mediadores como la desacetilasa mitocondrial Sirt3, la sirtuina mitocondrial más estudiada y asociada al mantenimiento de la homeostasis metabólica que, a su vez, es considerada como un elemento clave para retrasar la pérdida de funciones biológicas durante el envejecimiento (Kincaid B. and Bossy-Wetzel E., 2013).

Por su parte, la función mitocondrial también es modulada por la exposición al óxido nítrico. El NO, radical relativamente poco reactivo, sirve como una molécula mensajera en una variedad de sistemas fisiológicos y tiene la capacidad de formar especies de radicales tóxicos, como el peroxinitrito (ONOO⁻), que puede causar daño nitrosativo en biomoléculas, fallo de la degradación proteosómica, inhibición de la actividad enzimática e interferencia general de las funciones reguladoras (Knott A.B. and Bossy-Wetzel E., 2010). Todos estos fenómenos tienen lugar durante el envejecimiento, cuando aumentan los niveles de ROS y el anión superóxido (O₂⁻) se conjuga con NO para formar especies reactivas del nitrógeno y sus productos nitrato (NO₃⁻), nitrito (NO₂⁻) y peroxinitrito (ONOO⁻) que conllevan al daño, a la pérdida de funciones biológicas y finalmente a la muerte. Los RNS cumplen también un papel directo en la señalización celular, la vasodilatación y la respuesta inmune (Poderoso J.J., 1999; Lam P.Y., 2009; Perez-Gallardo R.V., 2014).

Muchas de las enfermedades neurodegenerativas están asociadas no solo al desbalance de la homeostasis metabólica mitocondrial *per se* sino también a cambios en la ultraestructura, la morfología y la dinámica de los eventos de fusión/fisión de estas organelas (Chen D. C., 2011; Zorzano A., 2015). En muchos estudios, las alteraciones en los niveles de ROS/RNS se han relacionado con cambios en la morfología mitocondrial, lo que sugiere una señalización bidireccional entre la homeostasis redox y la dinámica mitocondrial (Willems P. H., 2015). Aunque todavía no se han definido con certeza los parámetros que los regulan, en la actualidad se sabe que la morfología mitocondrial, esencial para mantener la función mitocondrial normal, es el resultado de continuos eventos de fusión y fisión regulados en parte por el estado redox (Chen H., 2005). Estos eventos están finamente concertados por las proteínas de fusión mitocondrial: proteína de la atrofia óptica 1 (Opa1), mitofusinas 1 y 2 (Mfn1 y Mfn2, respectivamente), y a su vez por las proteínas de fisión mitocondrial: proteína relacionada con dinamina 1 (Drp1) y proteína de fisión 1 (Fis1). Altos niveles de ROS/RNS se han asociado a modificaciones postraduccionales inducidas por redox (es decir, oxidación, nitración, S-nitrosilación, etc.) en varias de estas proteínas y en otras que interactúan con ellas, favoreciendo el desbalance entre estos procesos que conllevan a la pérdida de funciones biológicas en el envejecimiento (Cho D.H., 2009; Leboucher G. P., 2012; Sacksteder C. A., 2006).

La plasticidad y la densidad mitocondrial disminuyen con la edad, y a su vez la capacidad de biogénesis mitocondrial se reduce debido a la disminución de la actividad de PGC-1 α por procesos redox dependientes (Qiang W., 2007; Reznick R.M., 2007; Seo A.Y.,

2010). PGC-1 α es un coactivador transcripcional que mejora la actividad de factores de transcripción específicos, coordinando la expresión de genes importantes en la termogénesis adaptativa, la gluconeogénesis, la biogénesis mitocondrial y la respiración (Kong X., 2010). PGC1- α es el regulador principal de las enzimas antioxidantes depuradoras de ROS incluyendo a MnSOD y a la proteína desacopladora (UPC2), proteínas mitocondriales que pueden contribuir a la supervivencia neuronal (Chen S. D., 2011). Se ha descrito un vínculo entre la biogénesis y la morfología mitocondrial debido a que PGC-1 α regula la expresión de Mfn2. La represión de Mfn2 en las células disminuye el consumo de oxígeno, el potencial de membrana mitocondrial y la expresión de proteínas que intervienen en la fosforilación oxidativa (Seo A.Y., 2010).

La generación de ROS depende del balance entre la actividad mitocondrial y la capacidad de respuesta antioxidante (Hoffman D. L., 2009), pero en sí mismo puede percibirse como un sensor y transductor de señales en diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos enzimáticos mediados por genes (Cerqueira F.M., 2012). En los últimos años, se han establecido más casos de cooperación entre ROS y genes reguladores de la senescencia y del desarrollo del envejecimiento (Raffaello A. and Rizzuto R., 2011). La proteína adaptadora p66shc es un determinante genético de esperanza de vida que regula el metabolismo de ROS y la apoptosis celular.

Ante una señal de estrés (factor de crecimiento, activación del receptor de insulina, radiación excesiva o estrés oxidativo), PKC β fosforila a p66shc en Ser36, esto produce que PIN1 reconozca a p66shc y a partir de su isomerización transloque a mitocondrias. En el espacio intermembrana p66shc oxida al citocromo *c* evitando la transferencia de electrones a la citocromo oxidasa que deriva en altos niveles de reducción del complejo III (ubiquinol y citocromo *b-c1*) (Pelicci P. G., 2005). La inhibición del libre flujo de electrones determina la formación de semiubiquinona y la posterior reducción monoelectrónica de O₂ con formación de O₂⁻, eventualmente dismutado a H₂O₂ por la MnSOD y a H₂O por la catalasa (Boveris A., 1972). La ablación de p66shc en ratones se traduce en una disminución significativa de la producción mitocondrial de ROS y un 30% de aumento en la esperanza de vida (Migliaccio E., 1999). Se ha informado que los ratones *knock-out* para p66shc exhiben un aumento en la tasa metabólica y tienen menos grasa corporal que sus contrapartes de genotipo salvaje (Bermiakovich I., 2008). Lo más notable e interesante para los objetivos de esta tesis, es que se

los ha descrito como un modelo animal de envejecimiento saludable con mejores capacidades cognitivas y un mejor rendimiento físico en la vejez (Berry A., 2008).

Los niveles de expresión del p66shc varían según el órgano y la edad. En la juventud, los niveles de esta proteína en el cerebro son prácticamente indetectables, mientras que en la vejez su expresión aumenta significativamente (Sone K., 2012). Todos los parámetros oxidativos analizados en este trabajo mostraron que los cerebros de ratones p66^{shc(-/-)} jóvenes presentan los mismos niveles basales que sus contrapartes salvajes. Estos hallazgos podrían explicar por qué no se encuentran diferencias en el estado metabólico entre los grupos WT y p66^{shc(-/-)} en la juventud. Por lo tanto, p66shc podría considerarse un punto convergente entre la teoría del envejecimiento por estrés oxidativo y la teoría de senescencia programada.

Como discutimos previamente, el equilibrio entre la generación y la detoxificación de ROS es el principal determinante de esperanza de vida según la teoría del envejecimiento de Harman. Nuestros resultados demostraron que durante el envejecimiento, las mitocondrias de tejido nervioso de ratones p66^{shc(-/-)} exhibieron un menor desequilibrio redox y una disminución en la producción de O₂⁻ como así también en la actividad de su detoxificación. La activación de este mecanismo compensatorio podría no ser necesaria teniendo en cuenta la baja producción de ROS que observamos en estos ratones mutantes durante el envejecimiento.

Se han realizado esfuerzos considerables para comprender y explicar los efectos de los oxidantes (ROS y RNS) en el estrés oxidativo-nitrosativo resultante sobre los lípidos, las proteínas y el ADN, y su contribución al proceso de envejecimiento. Durante los últimos años, diferentes grupos, incluido el nuestro, definieron al NO como un modulador mitocondrial típico. Altos niveles de NO son perjudiciales y terminan en oxidación y nitración de proteínas que conducen a la pérdida de función mitocondrial y celular, mientras que niveles controlados de NO pueden inducir resistencia al estrés y la biogénesis mitocondrial (Nisoli E., 2005). Previamente, nuestro laboratorio ha demostrado que cuando se produce un aumento marcado en la producción de NO, como por ejemplo en el hipotiroidismo (Franco M. C. 2006), en la exposición a hipoxia (Giusti S. 2008) o en este caso, en el envejecimiento, una parte considerable del aumento en los niveles de H₂O₂ producidos por las mitocondrias es de fuentes NO-dependientes. En este modelo de envejecimiento saludable encontramos una disminución significativa en los niveles de producción de H₂O₂ independientemente del origen. En el grupo p66^{shc(-/-)}, tanto la capacidad de producción general de H₂O₂ como la NO-dependiente se encuentran por debajo de lo observado en los animales WT durante el envejecimiento. Estos

resultados nos llevan a pensar que p66shc y el metabolismo del NO se encuentran estrechamente relacionados.

Teniendo en cuenta que el metabolismo del NO implica aspectos reguladores sobre la producción de ROS y que las mitocondrias desempeñan un rol clave en el mantenimiento de la homeostasis metabólica celular (Carreras M. C., 2007), en los últimos años se ha profundizado el estudio de los mecanismos por los cuales las RNS contribuyen a la modulación mitocondrial de los procesos vitales en el envejecimiento (Gonzalez-Freire M., 2015;). De hecho, nuestro laboratorio ha observado en resultados preliminares que el aumento en la regulación de la nNOS en el cerebro de ratas durante el envejecimiento se correlaciona con el incremento en la nitración de proteínas mitocondriales. Otros grupos informan efectos similares en la regulación de nNOS durante el envejecimiento (Lam P. Y., 2009). Nuestros resultados muestran que a pesar de no detectar un claro aumento en la expresión de nNOS en el tejido nervioso durante el envejecimiento de ratones p66^{shc(-/-)}, fue posible observar la intensificación en su actividad que se correlacionó con el aumento en los niveles de NO detectados por citometría de flujo con DAF-FM.

Sin embargo, dicho aumento en los niveles de NO no derivó en una mayor detección de nitración de proteínas mitocondriales, fenómeno previamente observado por nuestro grupo en ratas Wistar durante el envejecimiento. Un efecto similar fue previamente publicado en estos ratones p66^{shc(-/-)} (Francia P., 2004). Los autores de ese trabajo informan que estos ratones mutantes se encontrarían protegidos contra la disfunción endotelial relacionada con la edad debido al incremento de la biodisponibilidad de NO sin conducir al aumento en la nitración de proteínas. Este notable efecto podría ser consecuencia de los bajos niveles de producción de O₂⁻ y H₂O₂ detectados durante el envejecimiento en ratones p66^{shc(-/-)}, ya que un ambiente con bajos niveles de ROS no favorecería la descomposición del NO para la ulterior formación de ONOO⁻.

Como hemos visto hasta ahora, existen evidencias previas que reportan un flujo de comunicación multidireccional entre los cambios en el equilibrio ROS/RNS y la biogénesis, la dinámica y la función mitocondrial (Lizana L., 2008; Mannella C. A., 2013; Willems P. H., 2015). En este trabajo mostramos que en el envejecimiento, las mitocondrias de tejido nervioso de ratones p66^{shc(-/-)} presentan una menor inhibición de la actividad del Complejo I de la cadena respiratoria, acompañada por un elevado consumo de oxígeno y un mayor contenido de ATP, en contraste con lo observado en los ratones WT. Posiblemente, este fenómeno ocurra debido

a la nitración irreversible del CI observada a altas concentraciones de ONOO⁻ (Yamamoto T., 2002).

A su vez, observamos una mayor inhibición de la actividad de citocromo *c* oxidasa (CIV) en los ratones p66^{shc(-/-)} durante el envejecimiento. Previamente sabíamos que concentraciones micro molares de NO son capaces de inhibir rápidamente de forma reversible al complejo IV a través de la formación de un derivado nitrosilado (Sarti P., 2003). Por este motivo, es probable que los altos niveles de biodisponibilidad de NO en estado estacionario registrados en mitocondrias de ratones p66^{shc(-/-)} sean los responsables de la inhibición observada en este complejo.

De todas maneras, el efecto inhibitorio del NO sobre la actividad del complejo IV parecería no ser suficiente para contrarrestar la mejora en los parámetros bioenergéticos observada en estos ratones *knock-out* durante el envejecimiento. Es interesante tener en cuenta que a pesar de que el NO es capaz de modular y regular la capacidad respiratoria a través de su unión e inhibición a la citocromo *c* oxidasa de forma reversible, el Complejo I es el que ejerce el mayor nivel de control de los complejos de la cadena de transporte de electrones sobre la fosforilación oxidativa, el consumo de oxígeno y la producción de ATP (Telford J. E., 2009). Esos resultados, junto con los resultados de este estudio, indican que inhibiciones superiores al ~ 10% del complejo I podrían causar inicialmente una disminución del consumo de oxígeno, que conduce a efectos posteriores como la despolarización del potencial de membrana mitocondrial, niveles disminuidos de ATP y mayores niveles de especies reactivas de oxígeno, tal cual se observa en los ratones WT durante el envejecimiento.

En una variedad de modelos que comprenden desde la levadura hasta los mamíferos (Bakeeva L. E., 1978; Kirkwood S. P., 1986; Rafelski S. M., 2013), las mitocondrias forman redes interconectadas que se someten a reordenamientos morfológicos continuos dependiendo del tejido y de los requerimientos energéticos (Bereiter-Hahn J., 1994; Chan D. C., 2006; Hoppins S., 2007). Cada “mitocondria” existe de forma independiente solo transitoriamente antes de fusionarse a la red mitocondrial o dividirse en organelas más pequeñas. La estructura mitocondrial depende de procesos altamente dinámicos como son el equilibrio entre sus tasas de fusión/fisión, biogénesis y mitofagia. En el envejecimiento, el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial se ve comprometido dada la pérdida de plasticidad de estos procesos.

Trabajos de otros autores describen que la despolarización mitocondrial inducida por ROS conlleva a la fragmentación, lo que sugiere que la fisión juega un papel indispensable en el estrés oxidativo mediado por mitocondrias (Gounden S., 2015). Actualmente, cada vez más estudios han revelado que la fisión mitocondrial tiende a manipular la apoptosis, la autofagia y la producción de ROS (Thomas K. J., 2012; Rambold A. S., 2011; Shenouda S. M., 2011; Huang Q., 2016; Twig G., 2008). Además, el proceso de fusión depende de $\Delta\Psi$, y por lo tanto, es posible que a través de su disminución, las ROS inhiban la fusión mitocondrial (Fan. X, 2010). En este trabajo mostramos que en el envejecimiento, las mitocondrias de tejido nervioso de ratones $p66^{shc(-/-)}$ presentan una mayor masa mitocondrial, un alto $\Delta\Psi$ mitocondrial y a su vez adoptan formas predominantemente tubulares o filamentosas, a diferencia de lo observado en este estudio y por otros grupos de investigación durante el proceso de envejecimiento normal (Barazzoni R., 2001).

Estos resultados son consistentes con nuestros ensayos de Western Blot y Real Time PCR sobre las proteínas involucradas en dinámica mitocondrial Mfn2, GTPasa de membrana externa mitocondrial directamente implicada en su fusión y Drp1, GTPasa que genera estructuras anulares que constriñen las mitocondrias en los eventos de fisión. Estos experimentos mostraron que a lo largo del envejecimiento en tejido nervioso de ratones $p66^{shc(-/-)}$ se incrementa la expresión de Mfn2 mientras que la expresión de Drp1 disminuye, a la inversa de lo observado en los ratones WT.

Se ha descrito que varias quinasas, incluida la familia de las quinasas dependientes de ciclinas (CDK), promueven la fisión mitocondrial a través de la fosforilación de Drp1 en Ser 616 (pDrp1-S616) (Tauguchi N., 2007). Mediante Western Blot de homogenatos de tejido nervioso de ratones $p66^{shc(-/-)}$, observamos baja cantidad de esta isoforma activa pDrp1-S616 en el envejecimiento, lo cual contrasta con los altos niveles de la misma detectados en ratones WT. Si bien es necesario un balance óptimo entre la fusión y fisión para el correcto funcionamiento de la célula, la fisión mitocondrial es parte imprescindible del *turnover* o recambio mitocondrial y se ha informado que la fosforilación de Drp1 en S616 mediada por AKT promueve fisión excesiva que conlleva a la apoptosis neural en modelos de Alzheimer (Kim D. I., 2016). Creemos que hacen falta experimentos para determinar la tasa de mitofagia a fin de poder profundizar en la comprensión del estado de la homeostasis mitocondrial en este modelo de envejecimiento.

Estos hallazgos sugieren una íntima relación entre el metabolismo redox y la dinámica mitocondrial ya que una morfología mitocondrial aberrante puede conducir a una mayor formación de ROS, que a su vez puede deteriorar la salud mitocondrial y exacerbar aún más el estrés oxidativo en un ciclo vicioso que se perpetúa a sí mismo. Cada vez más publicaciones informan modificaciones postraduccionales mediadas por RNS (nitrosilación/nitración) que regulan la actividad de proteínas relacionadas a los procesos de dinámica mitocondrial (Qiang W., 2007; Sammant S. A., 2014). Sería interesante en el futuro estudiar el estado de nitración de estas proteínas en el envejecimiento para así poder profundizar en la comprensión de la regulación de estos fenómenos.

Por otro lado, se ha observado que individuos centenarios poseen altos niveles de expresión de Sirt3 y que los cambios observados en el perfil de acetilación de las proteínas o “acetiloma” están relacionados con el envejecimiento normal y las enfermedades neurodegenerativas vinculadas a la edad (Puri P. L., 2010; Rose G., 2003). Sirt3, miembro de la familia de las desacetilasas dependientes de NAD, es la sirtuina de localización mitocondrial más estudiada y asociada al mantenimiento de la homeostasis metabólica y como nombramos previamente, a la modulación de la desacetilación de varias proteínas que participan en la regulación redox (Hallows W. C., 2011; Shi T., 2005). Si bien las bases moleculares y los mecanismos que conducen al aumento de la esperanza de vida aún no están claros, uno de los atributos más interesantes de esta enzima es que se la considera un elemento importante para el retraso de la pérdida de funciones biológicas durante el envejecimiento (Kincaid B., 2013).

Se ha informado la interacción física de Sirt3 con proteínas relacionadas al proceso de envejecimiento como por ejemplo FOXO3a, acetil-coA sintetasa (AceCS2) y PGC-1 α (Halaschek-Wiener J., 2009). La familia de los factores de transcripción FOXO es la homóloga humana del gen DAF-16 en *Caenorhabditis elegans*, que contribuye a la regulación de la esperanza de vida de los nematodos (Shi T., 2005). Por su parte, el complejo Sirt3/AceCS2 tiene un papel importante en la apoptosis y la regulación del crecimiento bajo ciertas condiciones ambientales en un tipo específico de células epiteliales no cancerosas (Allison S.J., 2007). La interacción Sirt3/PGC-1 α disminuye el daño inducido por estrés oxidativo al aumentar la resistencia de las defensas antioxidantes (Gounden S., 2015).

En el envejecimiento, la disminución gradual en la expresión y actividad de este regulador clave de la biogénesis mitocondrial resulta en una reducción de la generación de mitocondrias *de novo* y en el contenido de la masa mitocondrial de los tejidos (Short K. R.

2005; Koltai E., 2012). Sirt3 media la reducción de los niveles de ROS al estimular la expresión génica de PGC-1 α , y a su vez, la activación de PGC-1 α induce la expresión de Sirt3, creando un ciclo de retroalimentación positiva (Kong X., 2010). A partir de nuestros hallazgos, informamos que los ratones p66^{shc(-/-)} exhiben altos niveles de expresión de PGC-1 α y un mayor contenido mitocondrial en comparación con lo observado en los ratones del grupo WT durante el envejecimiento. Por consiguiente, es intuitivo pensar que el equilibrio alterado entre los eventos de fisión y fusión previamente descritos puedan estar también relacionado con un declive en la biogénesis mitocondrial dependiente de la edad (Chistiakov D. A., 2014).

Por último, nos preguntamos si los niveles alterados de ROS/RNS detectados en este modelo de envejecimiento saludable podrían modificar la estructura y actividad de Sirt3. A través de la utilización de un software bioinformático capaz de predecir modificaciones postraduccionales mediante un algoritmo GPS (*Group-based Prediction System*), analizamos la secuencia FASTA de esta enzima y encontramos una tirosina con buenas probabilidades de ser nitrada en la posición 100 de la secuencia murina de Sirt3 (Liu Z., 2011). Este aminoácido forma parte de un dominio de unión a NAD previamente descrito en esta enzima. Teniendo en cuenta estos datos y sabiendo que la disminución de los niveles de NAD durante el envejecimiento dificulta la correcta comunicación mitocondria-núcleo, es lógico pensar que altas concentraciones de ONOO⁻ serían capaces de nitrar esta enzima modificando su actividad a través de regular su capacidad de unir NAD (Afanas'ev I. B., 2005). Nuestros experimentos demostraron esta premisa ya que observamos que concentraciones crecientes de ONOO⁻ fueron capaces de disminuir la actividad de Sirt3 hasta en un 70% en experimentos *in vitro*.

A su vez, aunque la expresión de Sirt3 no se modificó con la edad en ninguno de los 2 genotipos estudiados, detectamos un aumento en los niveles de nitración de esta desacetilasa en los grupos de ratones WT envejecidos. En cambio en el grupo *knock-out*, los niveles de nitración de Sirt3 se mantuvieron bajos y los niveles de NAD se mantuvieron altos y constantes durante toda la vida, lo cual favorece el retraso en la pérdida de funciones biológicas. Por último, a partir de la co-incubación de lisados mitocondriales de ambos genotipos con rSirt3 demostramos también que el estado metabólico mitocondrial posee un efecto directo sobre la actividad de Sirt3. Los lisados mitocondriales de ratones p66^{shc(-/-)} con sus mejores parámetros bioenergéticos conservan hasta la vejez un ambiente fisiológico más favorable para la actividad de Sirt3.

Discusión

De acuerdo con todos estos datos podemos asumir que Sirt3 es sensible a la nitración y que su actividad está protegida contra la nitración mitocondrial observada en los ratones WT en el envejecimiento. Estos hallazgos sugieren una estrecha relación entre RNS y la actividad de desacetilación en las mitocondrias del cerebro.

9 CONCLUSIONES

La utilización de este modelo animal de envejecimiento saludable nos permitió profundizar en la comprensión de la relación bidireccional entre la homeostasis redox y los genes reguladores de la senescencia, analizando cómo los cambios en el metabolismo oxidativo/nitrosativo de los ratones $p66^{shc(-/-)}$ influyen en el equilibrio de la dinámica mitocondrial y en la actividad de Sirt3.

En este estudio, demostramos que las mitocondrias de tejido nervioso de ratones $p66^{shc(-/-)}$ envejecidos presentan una menor alteración del equilibrio redox y que existe un fuerte vínculo entre las especies reactivas de nitrógeno, la función, la morfología y la biogénesis mitocondrial (Perez H., 2018). También demostramos que la actividad de la desacetilasa Sirt3 es modulada por su estado de nitración y que dicha actividad en ratones $p66^{shc(-/-)}$ se ve potenciada durante el envejecimiento por la mayor biodisponibilidad de NAD observada en mitocondrias de tejido nervioso.

Nuestros resultados resaltan el rol fundamental de $p66^{shc}$ en múltiples procesos relacionados con el envejecimiento y regulados por mitocondrias. Mediante la modificación en la producción de ROS/RNS, que a su vez vimos regulan la actividad de Sirt3, la ausencia de $p66^{shc}$ mejora la homeostasis mitocondrial en los ratones *knock-out* durante el envejecimiento.

Tomados en conjunto, estos hallazgos podrían explicar parcialmente el retraso en la pérdida de las funciones biológicas durante el envejecimiento observado en el tejido nervioso de ratones $p66^{shc(-/-)}$. Por otra parte, la mejora en la homeostasis mitocondrial puede ser la causa subyacente de la mejora de la función cognitiva y psicomotriz observada en ratones $p66^{shc}$ *knock-out* durante el envejecimiento (Berry A., 2008). Será necesario un mayor esfuerzo y más estudios para comprender completamente este proceso complejo y multifactorial.

Como síntesis de los puntos más destacados de este trabajo, podríamos enumerar los siguientes hallazgos:

- El estado redox y la producción de ROS son inversamente regulados en mitocondrias aisladas de tejido nervioso de ratones WT y $p66^{shc(-/-)}$ durante el envejecimiento.
 - $p66^{shc}$ aumenta los niveles de producción de ROS y superóxido

Conclusiones

- p66shc aumenta la capacidad de producción máxima de H₂O₂ y de la NO-dependiente
- La actividad de nNOS y la producción de RNS se encuentran diferencialmente alteradas en el tejido nervioso de ratones p66^{shc(-/-)} longevos.
 - La actividad de nNOS en el envejecimiento se encuentra aumentada en ratones p66^{shc(-/-)}
 - Los niveles de NO biodisponible en el envejecimiento son superiores en los ratones p66^{shc(-/-)}
 - Los niveles de proteínas mitocondriales nitradas en el envejecimiento son menores en ratones p66^{shc(-/-)}
- Los cambios en el balance ROS/RNS en el tejido nervioso de ratones p66^{shc(-/-)} durante el envejecimiento modifican parámetros metabólicos mitocondriales.
 - La supresión de p66shc promueve el consumo de oxígeno durante el envejecimiento
 - La ablación de p66shc atenúa el descenso del contenido de ATP observado durante el envejecimiento
 - La supresión de p66shc mitiga el descenso de la relación NAD/NADH observado durante el envejecimiento
 - La ablación de p66shc atenúa el descenso del potencial de membrana ($\Delta\Psi$) observado en los ratones wt durante el envejecimiento
 - La actividad del complejo I disminuye más lentamente en ratones p66^{shc(-/-)} durante el envejecimiento
 - La actividad del complejo IV disminuye más abruptamente en ratones p66^{shc(-/-)} durante el envejecimiento
- La biomasa mitocondrial, la morfología y la ultraestructura se modifican en el envejecimiento del tejido nervioso de ratones p66^{shc(-/-)}.
 - La biomasa mitocondrial se encuentra conservada durante el envejecimiento en ratones p66^{shc(-/-)}
 - La biogénesis mitocondrial aumenta en ratones p66^{shc(-/-)} durante el envejecimiento
 - Los ratones p66^{shc(-/-)} presentan una estructura mitocondrial mayormente filamentosa o tubular en la vejez

- La ausencia de p66shc altera la homeostasis de la dinámica mitocondrial en el envejecimiento.
 - Fusión mitocondrial incrementada en ratones p66^{shc(-/-)}
 - Fisión mitocondrial disminuida en ratones p66^{shc(-/-)}
- La actividad de Sirt3 puede ser regulada a través de nitración por ONOO⁻.
 - Análisis *in silico* predicen un sitio de nitración para Sirt3 en un dominio de unión a NAD
 - Concentraciones crecientes de ONOO⁻ son capaces de inhibir la actividad de Sirt3
 - Bajos niveles de Sirt3 nitrada en ratones p66^{shc(-/-)} en el envejecimiento
 - Las mitocondrias de ratones p66^{shc(-/-)} poseen una fisiología/estado metabólico más propicio para la actividad de Sirt3 en el envejecimiento

10 PERSPECTIVAS FUTURAS

De acuerdo con la teoría del envejecimiento por radicales libres, este proceso se desencadena y sostiene por el efecto acumulativo deletéreo del daño oxidativo causado por las ROS generadas en la respiración mitocondrial. Por otro lado, la teoría del envejecimiento programado afirma que el envejecimiento y la muerte son partes necesarias de la evolución, y la baja variabilidad en la vida dentro de las especies demuestra que el envejecimiento no es solo un proceso de desgaste (Afanas'ev I. B., 2005; Knapp L. T. and Klann E., 2000; Ikeyama S., 2002; Jin Q., 2004; Colombo S.L., 2009).

p66shc y Sirt3, a través de su capacidad para modular la producción de ROS, son ejemplos claros del fuerte vínculo que existe entre el estrés oxidativo y la genética del envejecimiento. Las vías metabólicas que intervienen en sus funciones podrían ser objeto de potenciales estudios para desarrollar estrategias que retrasen el proceso de envejecimiento. En el futuro, el estudio de la modulación de la actividad de p66shc podría servir para el desarrollo de tratamientos terapéuticos orientados a conseguir una mayor esperanza de vida, o aún más importante, una mejor calidad de vida.

A lo largo de la discusión de este trabajo, hemos notado la necesidad de profundizar en diferentes aspectos del mismo, como por ejemplo, en la necesidad de estudiar procesos como la mitofagia. A través de citometría de flujo en células de tejido nervioso se podría evaluar el

Conclusiones

flujo mitofágico, así como también se podría estudiar la regulación de proteínas encargadas de mediar este proceso, por ejemplo LC3. Obtener una visión integral del estado general de los procesos que regulan la homeostasis mitocondrial sería de gran ayuda para comprender lo que está ocurriendo dentro de la célula durante el proceso de envejecimiento.

Queda pendiente para futuros trabajos estudiar el estado de nitración de estas proteínas en el envejecimiento para así profundizar en la comprensión de la regulación de estos fenómenos. Sería interesante utilizar modelos computacionales de estructura y modelado molecular para estudiar el mecanismo por el cual el ONOO⁻ es capaz de nitrar a Sirt3 en el dominio de unión a NAD. Este tipo de estudios permiten predecir a nivel molecular cuáles son los pasos de reacción más favorables termodinámicamente y así entender con precisión el mecanismo de nitración de esta proteína. A su vez, se podría estudiar qué sucede con su afinidad por NAD al modificar artificialmente la estructura de la proteína agregando un grupo nitro a la tirosina del dominio de unión a NAD. A través de modelo por homología se podrían buscar fármacos que reviertan los efectos de los bajos niveles de NAD detectados en el envejecimiento, con el objetivo de atenuar la disminución de la actividad desacetilasa de esta enzima en las últimas etapas de la vida.

11 BIBLIOGRAFÍA

- Afanas'ev, I. (2010). Signaling and damaging functions of free radicals in aging—Free radical theory, hormesis, and TOR. *Aging and disease*, 1(2), 75.
- Afanas'ev, I. B. (2005). Free radical mechanisms of aging processes under physiological conditions. *Biogerontology*, 6(4), 283-290.
- Allison, S. J., & Milner, J. O. (2007). SIRT3 is pro-apoptotic and participates in distinct basal apoptotic pathways. *Cell cycle*, 6(21), 2669-2677.
- Ames, B. N., Cathcart, R., Schwiers, E., & Hochstein, P. (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant-and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(11), 6858-6862.
- Ara, J., Przedborski, S., Naini, A. B., Jackson-Lewis, V., Trifiletti, R. R., Horwitz, J., & Ischiropoulos, H. (1998). Inactivation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxynitrite and 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(13), 7659-7663.
- Archer, S. L. (2013). Mitochondrial dynamics—mitochondrial fission and fusion in human diseases. *New England Journal of Medicine*, 369(23), 2236-2251.
- Bakeeva, L. E., Chentsov, Y. S., & Skulachev, V. P. (1978). Mitochondrial framework (reticulum mitochondriale) in rat diaphragm muscle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 501(3), 349-369.
- Barazzoni, R., & Nair, K. S. (2001). Changes in uncoupling protein-2 and-3 expression in aging rat skeletal muscle, liver, and heart. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 280(3), E413-E419.
- Barja, G. (1999). Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 31(4), 347-366.
- Barja, G. (2002). Rate of generation of oxidative stress-related damage and animal longevity. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(9), 1167-1172.
- Barja, G., & Herrero, A. (1998). Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain nonsynaptic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 30(3), 235-243.
- Barja, G., & Herrero, A. (2000). Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *The FASEB Journal*, 14(2), 312-318.
- Bereiter-Hahn, J., & Vöth, M. (1994). Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microscopy research and technique*, 27(3), 198-219.

Bibliografia

- Berniakovich, I., Trinei, M., Stendardo, M., Migliaccio, E., Minucci, S., Bernardi, P., ... & Giorgio, M. (2008). p66Shc-generated oxidative signal promotes fat accumulation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(49), 34283-34293.
- Berry, A., Greco, A., Giorgio, M., Pelicci, P. G., De Kloet, R., Alleva, E., ... & Cirulli, F. (2008). Deletion of the lifespan determinant p66 Shc improves performance in a spatial memory task, decreases levels of oxidative stress markers in the hippocampus and increases levels of the neurotrophin BDNF in adult mice. *Experimental gerontology*, 43(3), 200-208.
- Birsa, N., Norkett, R., Higgs, N., Lopez-Domenech, G., & Kittler, J. T. (2013). Mitochondrial trafficking in neurons and the role of the Miro family of GTPase proteins.
- Bishop, N. A., Lu, T., & Yankner, B. A. (2010). Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature*, 464(7288), 529.
- Bjorksten, J. (1968). The crosslinkage theory of aging. *Journal of the American Geriatrics Society*, 16(4), 408-427.
- Bjorksten, J., & Tenhu, H. (1990). The crosslinking theory of aging—Added evidence. *Experimental gerontology*, 25(2), 91-95.
- Blough, N. V., & Zafiriou, O. C. (1985). Reaction of superoxide with nitric oxide to form peroxonitrite in alkaline aqueous solution. *Inorganic Chemistry*, 24(22), 3502-3504.
- Borradaile, N. M., & Pickering, J. G. (2009). Nicotinamide phosphoribosyltransferase imparts human endothelial cells with extended replicative lifespan and enhanced angiogenic capacity in a high glucose environment. *Aging cell*, 8(2), 100-112.
- Boveris, A., Oshino, N., & Chance, B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochemical Journal*, 128(3), 617-630.
- Brenman, J. E., Xia, H., Chao, D. S., Black, S. M., & Bredt, D. S. (1997). Regulation of neuronal nitric oxide synthase through alternative transcripts. *Developmental neuroscience*, 19(3), 224-231.
- Brys, K., Vanfleteren, J. R., & Braeckman, B. P. (2007). Testing the rate-of-living/oxidative damage theory of aging in the nematode model *Caenorhabditis elegans*. *Experimental gerontology*, 42(9), 845-851.
- Campisi, J. (2000). Cancer, aging and cellular senescence. *In vivo (Athens, Greece)*, 14(1), 183-188.
- Cardoso, S. M., Pereira, C., & Oliveira, C. R. (1999). Mitochondrial function is differentially affected upon oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(1-2), 3-13.
- Carreras, M. C., & Poderoso, J. J. (2007). Mitochondrial nitric oxide in the signaling of cell integrated responses. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 292(5), C1569-C1580.

- Carreras, M. C., Converso, D. P., Lorenti, A. S., Barbich, M., Levisman, D. M., Jaitovich, A., ... & Poderoso, J. J. (2004). Mitochondrial nitric oxide synthase drives redox signals for proliferation and quiescence in rat liver development. *Hepatology*, *40*(1), 157-166.
- Carreras, M. C., Melani, M., Riobó, N., Converso, D. P., Gatto, E. M., & Poderoso, J. J. (2002). Neuronal nitric oxide synthases in brain and extraneural tissues. In *Methods in enzymology* (Vol. 359, pp. 413-423). Academic Press.
- Carreras, M. C., Peralta, J. G., Converso, D. P., Finocchietto, P. V., Rebagliati, I., Zaninovich, A. A., & Poderoso, J. J. (2001). Modulation of liver mitochondrial NOS is implicated in thyroid-dependent regulation of O₂ uptake. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *281*(6), H2282-H2288.
- Cerqueira, F. M., Cunha, F. M., Laurindo, F. R., & Kowaltowski, A. J. (2012). Calorie restriction increases cerebral mitochondrial respiratory capacity in a NO•-mediated mechanism: impact on neuronal survival. *Free Radical Biology and Medicine*, *52*(7), 1236-1241.
- Challis, B. C., & Kyrtopoulos, S. A. (1978). The chemistry of nitroso compounds. Part 12. The mechanism of nitrosation and nitration of aqueous piperidine by gaseous dinitrogen tetroxide and dinitrogen trioxide in aqueous alkaline solutions. Evidence for the existence of molecular isomers of dinitrogen tetroxide and dinitrogen trioxide. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (12), 1296-1302.
- Chan, D. C. (2006). Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, *22*, 79-99.
- Chan, D. C. (2012). Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annual review of genetics*, *46*.
- Chance, B. (1954). Special methods: catalase. *New York: Interscience*, 408-24.
- Chandel, N. S. (2010). Mitochondrial regulation of oxygen sensing. In *Membrane Receptors, Channels and Transporters in Pulmonary Circulation* (pp. 339-354). Humana Press, Totowa, NJ.
- Chen, H., & Chan, D. C. (2005). Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Human molecular genetics*, *14*(suppl_2), R283-R289.
- Chen, S. D., Yang, D. I., Lin, T. K., Shaw, F. Z., Liou, C. W., & Chuang, Y. C. (2011). Roles of oxidative stress, apoptosis, PGC-1 α and mitochondrial biogenesis in cerebral ischemia. *International journal of molecular sciences*, *12*(10), 7199-7215.
- Chinta, S. J., & Andersen, J. K. (2006). Reversible inhibition of mitochondrial complex I activity following chronic dopaminergic glutathione depletion in vitro: implications for Parkinson's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, *41*(9), 1442-1448.
- Chistiakov, D. A., Sobenin, I. A., Revin, V. V., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2014). Mitochondrial aging and age-related dysfunction of mitochondria. *BioMed research international*, 2014.

- Cho, D. H., Nakamura, T., Fang, J., Cieplak, P., Godzik, A., Gu, Z., & Lipton, S. A. (2009). S-nitrosylation of Drp1 mediates β -amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science*, 324(5923), 102-105.
- Cogliati, S., Frezza, C., Soriano, M. E., Varanita, T., Quintana-Cabrera, R., Corrado, M., ... & Perales-Clemente, E. (2013). Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell*, 155(1), 160-171.
- Cohen, G., Dembiec, D., & Marcus, J. (1970). Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Analytical biochemistry*, 34(1), 30-38.
- Colombo, S. L., & Moncada, S. (2009). AMPK α 1 regulates the antioxidant status of vascular endothelial cells. *Biochemical Journal*, 421(2), 163-169.
- Cornelius, E. A. (1972). Increased incidence of lymphomas in thymectomized mice-evidence for an immunological theory of aging. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 28(4), 459-459.
- Crane, B. R., Arvai, A. S., Ghosh, D. K., Wu, C., Getzoff, E. D., Stuehr, D. J., & Tainer, J. A. (1998). Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. *Science*, 279(5359), 2121-2126.
- Davidovic, M., Sevo, G., Svorcan, P., Milosevic, D. P., Despotovic, N., & Erceg, P. (2010). Old age as a privilege of the "selfish ones". *Aging and disease*, 1(2), 139
- Davis, C. W., Hawkins, B. J., Ramasamy, S., Irintki, K. M., Cameron, B. A., Islam, K., ... & Madesh, M. (2010). Nitration of the mitochondrial complex I subunit NDUFB8 elicits RIP1- and RIP3-mediated necrosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(2), 306-317.
- de Araujo, L. F., Fonseca, A. S., Muys, B. R., Plaça, J. R., Bueno, R. B., Lorenzi, J. C., ... & Valente, V. (2015). Mitochondrial genome instability in colorectal adenoma and adenocarcinoma. *Tumor Biology*, 36(11), 8869-8879.
- Deeb, R. S., Hao, G., Gross, S. S., Lainé, M., Qiu, J. H., Resnick, B., ... & Upmacis, R. K. (2006). Heme catalyzes tyrosine 385 nitration and inactivation of prostaglandin H2 synthase-1 by peroxynitrite. *Journal of lipid research*, 47(5), 898-911.
- Denicola, A., Souza, J. M., & Radi, R. (1998). Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(7), 3566-3571.
- Dieteren, C. E., Willems, P. H., Swarts, H. G., Fransen, J., Smeitink, J. A., Koopman, W. J., & Nijtmans, L. G. (2011). Defective mitochondrial translation differently affects the live cell dynamics of complex I subunits. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1807(12), 1624-1633.
- Dudkina, N. V., Eubel, H., Keegstra, W., Boekema, E. J., & Braun, H. P. (2005). Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(9), 3225-3229.

- Espinosa-Diez, C., Miguel, V., Mennerich, D., Kietzmann, T., Sánchez-Pérez, P., Cadenas, S., & Lamas, S. (2015). Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox biology*, 6, 183-197.
- Estabrook, R. W. (1967). [7] Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP: O ratios. In *Methods in enzymology* (Vol. 10, pp. 41-47). Academic Press.
- Fan, X., Hussien, R., & Brooks, G. A. (2010). H₂O₂-induced mitochondrial fragmentation in C2C12 myocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(11), 1646-1654.
- Ferrón, S. R., Marqués-Torrejón, M. Á., Mira, H., Flores, I., Taylor, K., Blasco, M. A., & Farinas, I. (2009). Telomere shortening in neural stem cells disrupts neuronal differentiation and neurogenesis. *Journal of Neuroscience*, 29(46), 14394-14407.
- Finkel, T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of cell biology*, 194(1), 7-15.
- Fischmann, T. O., Hruza, A., Da Niu, X., Fossetta, J. D., Lunn, C. A., Dolphin, E., ... & Weber, P. C. (1999). Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation. *Nature Structural and Molecular Biology*, 6(3), 233.
- Flores, I., Cayuela, M. L., & Blasco, M. A. (2005). Effects of telomerase and telomere length on epidermal stem cell behavior. *Science*, 309(5738), 1253-1256.
- Ford, E., Voit, R., Liszt, G., Magin, C., Grummt, I., & Guarente, L. (2006). Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. *Genes & development*, 20(9), 1075-1080.
- Förstermann, U., & Sessa, W. C. (2011). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*, 33(7), 829-837.
- Förstermann, U., & Sessa, W. C. (2011). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*, 33(7), 829-837.
- Franco, M. C., Arciuch, V. G. A., Peralta, J. G., Galli, S., Levisman, D., López, L. M., ... & Carreras, M. C. (2006). Hypothyroid phenotype is contributed by mitochondrial complex I inactivation due to translocated neuronal nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 281(8), 4779-4786.
- Fukuto, J. M., Cho, J. Y., & Switzer, C. H. (2000). The chemical properties of nitric oxide and related nitrogen oxides. In *Nitric Oxide* (pp. 23-40).
- Garcin, E. D., Bruns, C. M., Lloyd, S. J., Hosfield, D. J., Tiso, M., Gachhui, R., ... & Getzoff, E. D. (2004). Structural basis for isozyme-specific regulation of electron transfer in nitric-oxide synthase. *Journal of biological chemistry*, 279(36), 37918-37927.

Geller, D. A., Lowenstein, C. J., Shapiro, R. A., Nussler, A. K., Di Silvio, M., Wang, S. C., ... & Billiar, T. R. (1993). Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(8), 3491-3495.

Gerschman, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., Dwyer, P., & Fenn, W. O. (2005). Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science's SAGE KE*, 2005(17), cp1.

Ghosh, D. K., Wu, C., Pitters, E., Moloney, M., Werner, E. R., Mayer, B., & Stuehr, D. J. (1997). Characterization of the inducible nitric oxide synthase oxygenase domain identifies a 49 amino acid segment required for subunit dimerization and tetrahydrobiopterin interaction. *Biochemistry*, 36(35), 10609-10619.

Giorgio, M., Migliaccio, E., Orsini, F., Paolucci, D., Moroni, M., Contursi, C., ... & Pinton, P. (2005). Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell*, 122(2), 221-233.

Giulivi, C., Poderoso, J. J., & Boveris, A. (1998). Production of nitric oxide by mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 273(18), 11038-11043.

Giusti, S., Converso, D. P., Poderoso, J. J., & Fiszer de Plazas, S. (2008). Hypoxia induces complex I inhibition and ultrastructural damage by increasing mitochondrial nitric oxide in developing CNS. *European Journal of Neuroscience*, 27(1), 123-131.

Gomes, A. P., Price, N. L., Ling, A. J., Moslehi, J. J., Montgomery, M. K., Rajman, L., ... & Mercken, E. M. (2013). Declining NAD⁺ induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging. *Cell*, 155(7), 1624-1638.

Gonzalez, A. S., Elguero, M. E., Finocchietto, P., Holod, S., Romorini, L., Miriuka, S. G., ... & Carreras, M. C. (2014). Abnormal mitochondrial fusion-fission balance contributes to the progression of experimental sepsis. *Free radical research*, 48(7), 769-783.

Gonzalez-Freire, M., De Cabo, R., Bernier, M., Sollott, S. J., Fabbri, E., Navas, P., & Ferrucci, L. (2015). Reconsidering the role of mitochondria in aging. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 70(11), 1334-1342.

Gounden, S., Phulukdaree, A., Moodley, D., & Chuturgoon, A. (2015). Increased SIRT3 expression and antioxidant defense under hyperglycemic conditions in HepG2 cells. *Metabolic syndrome and related disorders*, 13(6), 255-263.

Gruez, A., Pignol, D., Zeghouf, M., Covès, J., Fontecave, M., Ferrer, J. L., & Fontecilla-Camps, J. C. (2000). Four crystal structures of the 60 kDa flavoprotein monomer of the sulfite reductase indicate a disordered flavodoxin-like module1. *Journal of molecular biology*, 299(1), 199-212.

Halaschek-Wiener, J., Amirabbasi-Beik, M., Monfared, N., Pieczyk, M., Sailer, C., Kollar, A., ... & Collins, J. A. (2009). Genetic variation in healthy oldest-old. *PLoS One*, 4(8), e6641.

Bibliografia

- Hallows, W. C., Lee, S., & Denu, J. M. (2006). Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(27), 10230-10235.
- Hallows, W. C., Yu, W., Smith, B. C., DeVires, M. K., Ellinger, J. J., Someya, S., ... & Zhao, S. (2011). Sirt3 promotes the urea cycle and fatty acid oxidation during dietary restriction. *Molecular cell*, *41*(2), 139-149.
- Hari, R., Burde, V., & Arking, R. (1998). Immunological confirmation of elevated levels of CuZn superoxide dismutase protein in an artificially selected long-lived strain of *Drosophila melanogaster*. *Experimental gerontology*, *33*(3), 227-237.
- Harman, D. (1992). Free radical theory of aging. *Mutation Research/DNAging*, *275*(3-6), 257-266.
- Harman, D. (2002). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Science's SAGE KE*, *2002*(37), 14.
- Haun, F., Nakamura, T., Shiu, A. D., Cho, D. H., Tsunemi, T., Holland, E. A., ... & Lipton, S. A. (2013). S-nitrosylation of dynamin-related protein 1 mediates mutant huntingtin-induced mitochondrial fragmentation and neuronal injury in Huntington's disease. *Antioxidants & redox signaling*, *19*(11), 1173-1184.
- Hayflick, L. (1994). Trypsin in poliovaccine manufacture. *The Lancet*, *343*(8897), 611.
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research*, *25*(3), 585-621.
- Herbig, U., Ferreira, M., Condel, L., Carey, D., & Sedivy, J. M. (2006). Cellular senescence in aging primates. *Science*, *311*(5765), 1257-1257.
- Hoffman, D. L., & Brookes, P. S. (2009). Oxygen sensitivity of mitochondrial reactive oxygen species generation depends on metabolic conditions. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(24), 16236-16245.
- Hoppins, S., Lackner, L., & Nunnari, J. (2007). The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.*, *76*, 751-780.
- Huang, Q., Zhan, L., Cao, H., Li, J., Lyu, Y., Guo, X., ... & Liu, B. (2016). Increased mitochondrial fission promotes autophagy and hepatocellular carcinoma cell survival through the ROS-modulated coordinated regulation of the NFKB and TP53 pathways. *Autophagy*, *12*(6), 999-1014.
- Huie, R. E., & Padmaja, S. (1993). The reaction of NO with superoxide. *Free radical research communications*, *18*(4), 195-199.
- Hulbert, A. J., Pamplona, R., Buffenstein, R., & Buttemer, W. A. (2007). Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiological reviews*, *87*(4), 1175-1213.

- Ikeyama, S., Kokkonen, G., Shack, S., Wang, X. T., & Holbrook, N. J. (2002). Loss in oxidative stress tolerance with aging linked to reduced extracellular signal-regulated kinase and Akt kinase activities. *The FASEB journal*, *16*(1), 114-116.
- Jang, B., & Han, S. (2006). Biochemical properties of cytochrome c nitrated by peroxynitrite. *Biochimie*, *88*(1), 53-58.
- Jin, K. (2010). Modern biological theories of aging. *Aging and disease*, *1*(2), 72.
- Jin, K., Minami, M., Xie, L., Sun, Y., Mao, X. O., Wang, Y., ... & Greenberg, D. A. (2004). Ischemia-induced neurogenesis is preserved but reduced in the aged rodent brain. *Aging cell*, *3*(6), 373-377.
- Jin, Q., Jhun, B. S., Lee, S. H., Lee, J., Pi, Y., Cho, Y. H., ... & Kang, I. (2004). Differential regulation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt, mitogen-activated protein kinase, and AMP-activated protein kinase pathways during menadione-induced oxidative stress in the kidney of young and old rats. *Biochemical and biophysical research communications*, *315*(3), 555-561.
- Kang, B. S., Cooper, D. R., Devedjiev, Y., Derewenda, U., & Derewenda, Z. S. (2003). Molecular roots of degenerate specificity in syntenin's PDZ2 domain: reassessment of the PDZ recognition paradigm. *Structure*, *11*(7), 845-853.
- Kawahara, T. L., Michishita, E., Adler, A. S., Damian, M., Berber, E., Lin, M., ... & Chua, K. F. (2009). SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF- κ B-dependent gene expression and organismal life span. *Cell*, *136*(1), 62-74.
- Kim, E., & Sheng, M. (2004). PDZ domain proteins of synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, *5*(10), 771.
- Kincaid, B., & Bossy-Wetzel, E. (2013). Forever young: SIRT3 a shield against mitochondrial meltdown, aging, and neurodegeneration. *Frontiers in aging neuroscience*, *5*, 48.
- Kirkwood, S. P., Munn, E. A., & Brooks, G. A. (1986). Mitochondrial reticulum in limb skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *251*(3), C395-C402.
- Klatt, P., Schmidt, K., Brunner, F., & Mayer, B. (1994). Inhibitors of brain nitric oxide synthase. Binding kinetics, metabolism, and enzyme inactivation. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(3), 1674-1680.
- Knapp, L. T., & Klamm, E. (2000). Superoxide-induced stimulation of protein kinase C via thiol modification and modulation of zinc content. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(31), 24136-24145.
- Knott, A. B., & Bossy-Wetzel, E. (2010). Impact of nitric oxide on metabolism in health and age-related disease. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *12*(s2), 126-133.
- Knowles, R. G., & Salter, M. (1998). Measurement of NOS activity by conversion of radiolabeled arginine to citrulline using ion-exchange separation. In *Nitric oxide protocols* (pp. 67-73). Humana Press.

Koltai, E., Hart, N., Taylor, A. W., Goto, S., Ngo, J. K., Davies, K. J., & Radak, Z. (2012). Age-associated declines in mitochondrial biogenesis and protein quality control factors are minimized by exercise training. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 303(2), R127-R134.

Kong, X., Wang, R., Xue, Y., Liu, X., Zhang, H., Chen, Y., ... & Chang, Y. (2010). Sirtuin 3, a new target of PGC-1 α , plays an important role in the suppression of ROS and mitochondrial biogenesis. *PLoS one*, 5(7), e11707.

Ku, H. H., Brunk, U. T., & Sohal, R. S. (1993). Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Radical Biology and Medicine*, 15(6), 621-627.

Lam, P. Y., Yin, F., Hamilton, R. T., Boveris, A., & Cadenas, E. (2009). Elevated neuronal nitric oxide synthase expression during ageing and mitochondrial energy production. *Free radical research*, 43(5), 431-439.

Larsen, P. L. (1993). Aging and resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(19), 8905-8909.

Leboucher, G. P., Tsai, Y. C., Yang, M., Shaw, K. C., Zhou, M., Veenstra, T. D., ... & Weissman, A. M. (2012). Stress-induced phosphorylation and proteasomal degradation of mitofusin 2 facilitates mitochondrial fragmentation and apoptosis. *Molecular cell*, 47(4), 547-557.

Lee, Y. J., Jeong, S. Y., Karbowski, M., Smith, C. L., & Youle, R. J. (2004). Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Molecular biology of the cell*, 15(11), 5001-5011.

Liu, Z., Cao, J., Ma, Q., Gao, X., Ren, J., & Xue, Y. (2011). GPS-YNO2: computational prediction of tyrosine nitration sites in proteins. *Molecular BioSystems*, 7(4), 1197-1204.

Lizana, L., Bauer, B., & Orwar, O. (2008). Controlling the rates of biochemical reactions and signaling networks by shape and volume changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(11), 4099-4104.

Lizana, L., Bauer, B., & Orwar, O. (2008). Controlling the rates of biochemical reactions and signaling networks by shape and volume changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(11), 4099-4104.

Lombard, D. B., Alt, F. W., Cheng, H. L., Bunkenborg, J., Streeper, R. S., Mostoslavsky, R., ... & Yang, Y. (2007). Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Molecular and cellular biology*, 27(24), 8807-8814.

López-Lluch, G., & Navas, P. (2016). Calorie restriction as an intervention in ageing. *The Journal of physiology*, 594(8), 2043-2060.

Lowenstein, C. J., Dinerman, J. L., & Snyder, S. H. (1994). Nitric oxide: a physiologic messenger. *Annals of internal medicine*, 120(3), 227-237.

Bibliografia

- Luzi, L., Confalonieri, S., Di Fiore, P. P., & Pelicci, P. G. (2000). Evolution of Shc functions from nematode to human. *Current opinion in genetics & development*, 10(6), 668-674.
- Mannella, C. A., Lederer, W. J., & Jafri, M. S. (2013). The connection between inner membrane topology and mitochondrial function. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 62, 51-57.
- Masoro, E. J. (2005). Overview of caloric restriction and ageing. *Mechanisms of ageing and development*, 126(9), 913-922.
- McCay, C. M. (1935). Iodized salt a hundred years ago. *Science*, 82(2128), 350-351.
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions I. radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6056-6063.
- Migliaccio, E., Giorgio, M., Mele, S., Pelicci, G., Reboldi, P., Pandolfi, P. P., ... & Pelicci, P. G. (1999). The p66 shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature*, 402(6759), 309.
- Migliaccio, E., Mele, S., Salcini, A. E., Pelicci, G., Lai, K. M. V., Superti-Furga, G., ... & Pelicci, P. G. (1997). Opposite effects of the p52shc/p46shc and p66shc splicing isoforms on the EGF receptor–MAP kinase–fos signalling pathway. *The EMBO journal*, 16(4), 706-716.
- Miller, R. A. (1994). The biology of aging and longevity. *Principles of Geriatric Medicine and Gerontology*. 3rd ed. New York, NY: McGraw-Hill Professions, 504, 3-18.
- Mitchell, P., & Moyle, J. (1967). Respiration-driven proton translocation in rat liver mitochondria. *Biochemical Journal*, 105(3), 1147-1162.
- Mitnitski, A. B. (2018). Epigenetic Biomarkers for Biological Age. In *Epigenetics of Aging and Longevity* (pp. 153-170).
- Mitsui, A., Hamuro, J., Nakamura, H., Kondo, N., Hirabayashi, Y., Ishizaki-Koizumi, S., ... & Yodoi, J. (2002). Overexpression of human thioredoxin in transgenic mice controls oxidative stress and life span. *Antioxidants and Redox Signaling*, 4(4), 693-696.
- Mozdy, A. D., McCaffery, J. M., & Shaw, J. M. (2000). Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *The Journal of cell biology*, 151(2), 367-380.
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1-13.
- Navarro, A., & Boveris, A. (2008). Mitochondrial nitric oxide synthase, mitochondrial brain dysfunction in aging, and mitochondria-targeted antioxidants. *Advanced drug delivery reviews*, 60(13-14), 1534-1544.

- Nicholls, D. G. (2002). Mitochondrial function and dysfunction in the cell: its relevance to aging and aging-related disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 34(11), 1372-1381.
- Nisoli, E., Tonello, C., Cardile, A., Cozzi, V., Bracale, R., Tedesco, L., ... & Moncada, S. (2005). Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science*, 310(5746), 314-317.
- North, B. J., Marshall, B. L., Borra, M. T., Denu, J. M., & Verdin, E. (2003). The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Molecular cell*, 11(2), 437-444.
- Nourry, C., Grant, S. G., & Borg, J. P. (2003). PDZ domain proteins: plug and play!. *Science Signaling*, 2003(179), re7-re7.
- Orr, W. C., & Sohal, R. S. (1994). Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science*, 263(5150), 1128-1130.
- Orsini, F., Migliaccio, E., Moroni, M., Contursi, C., Raker, V. A., Piccini, D., ... & Puri, C. (2004). The life span determinant p66Shc localizes to mitochondria where it associates with mitochondrial heat shock protein 70 and regulates trans-membrane potential. *Journal of Biological Chemistry*, 279(24), 25689-25695.
- Pacher, P., Beckman, J. S., & Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological reviews*, 87(1), 315-424.
- Pacini, S., Pellegrini, M., Migliaccio, E., Patrussi, L., Olivieri, C., Ventura, A., ... & Baldari, C. T. (2004). p66SHC promotes apoptosis and antagonizes mitogenic signaling in T cells. *Molecular and Cellular Biology*, 24(4), 1747-1757.
- Paine, M. J., Garner, A. P., Powell, D., Sibbald, J., Sales, M., Pratt, N., ... & Wolf, C. R. (2000). Cloning and characterization of a novel human dual flavin reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(2), 1471-1478.
- Palmer, C. S., Osellame, L. D., Laine, D., Koutsopoulos, O. S., Frazier, A. E., & Ryan, M. T. (2011). MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO reports*, 12(6), 565-573.
- Panda, K., Adak, S., Aulak, K. S., Santolini, J., McDonald, J. F., & Stuehr, D. J. (2003). Distinct influence of N-terminal elements on neuronal nitric-oxide synthase structure and catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(39), 37122-37131.
- Pelicci, G., Dente, L., De Giuseppe, A., Verducci-Galletti, B., Giuli, S., Mele, S., ... & Pelicci, P. G. (1996). A family of Shc related proteins with conserved PTB, CH1 and SH2 regions. *Oncogene*, 13(3), 633-641.
- Pelicci, G., Lanfrancone, L., Grignani, F., McGlade, J., Cavallo, F., Forni, G., ... & Pelicci, P. G. (1992). A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell*, 70(1), 93-104.

- Pellicci, P. G. (2005). Electron transfer between cytochrome C and P66SHC generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *The Febs Journal*, 272, 319-320.
- Pérez, H., Finocchietto, P. V., Alippe, Y., Rebagliati, I., Elguero, M. E., Villalba, N., ... & Carreras, M. C. (2018). p66Shc Inactivation Modifies RNS Production, Regulates Sirt3 Activity, and Improves Mitochondrial Homeostasis, Delaying the Aging Process in Mouse Brain. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018.
- Pérez, V. I., Van Remmen, H., Bokov, A., Epstein, C. J., Vijg, J., & Richardson, A. (2009). The overexpression of major antioxidant enzymes does not extend the lifespan of mice. *Aging cell*, 8(1), 73-75.
- Pérez-Gallardo, R. V., Noriega-Cisneros, R., Esquivel-Gutiérrez, E., Calderón-Cortés, E., Cortés-Rojo, C., Manzo-Avalos, S., ... & Saavedra-Molina, A. (2014). Effects of diabetes on oxidative and nitrosative stress in kidney mitochondria from aged rats. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 46(6), 511-518.
- Picard, M., Shirihai, O. S., Gentil, B. J., & Burrelle, Y. (2013). Mitochondrial morphology transitions and functions: implications for retrograde signaling?. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 304(6), R393-R406.
- Pinton, P., Rimessi, A., Marchi, S., Orsini, F., Migliaccio, E., Giorgio, M., ... & Del Sal, G. (2007). Protein Kinase C β and prolyl isomerase 1 regulate mitochondrial effects of the life-span determinant p66Shc. *Science*, 315(5812), 659-663.
- Poderoso, J. J., Lisdero, C., Schöpfer, F., Riobó, N., Carreras, M. C., Cadenas, E., & Boveris, A. (1999). The regulation of mitochondrial oxygen uptake by redox reactions involving nitric oxide and ubiquinol. *Journal of Biological Chemistry*, 274(53), 37709-37716.
- Pryor, W. A., & Squadrito, G. L. (1995). The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 268(5), L699-L722.
- Puri, P. L., & Sartorelli, V. (2010). HDACs and sirtuins: Targets for new pharmacological interventions in human diseases.
- Qiang, W., Weiqiang, K., Qing, Z., Pengju, Z., & Yi, L. (2007). Aging impairs insulin-stimulated glucose uptake in rat skeletal muscle via suppressing AMPK α . *Experimental & molecular medicine*, 39(4), 535.
- Qiu, X., Brown, K., Hirschey, M. D., Verdin, E., & Chen, D. (2010). Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. *Cell metabolism*, 12(6), 662-667.
- Radi, R., Cassina, A., Hodara, R., Quijano, C., & Castro, L. (2002). Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(11), 1451-1464.
- Rafelski, S. M. (2013). Mitochondrial network morphology: building an integrative, geometrical view. *BMC biology*, 11(1), 71.

- Raffaello, A., & Rizzuto, R. (2011). Mitochondrial longevity pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1813*(1), 260-268.
- Rambold, A. S., Kostecky, B., Elia, N., & Lippincott-Schwartz, J. (2011). Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(25), 10190-10195.
- Renken, C., Siragusa, G., Perkins, G., Washington, L., Nulton, J., Salamon, P., & Frey, T. G. (2002). A thermodynamic model describing the nature of the crista junction: a structural motif in the mitochondrion. *Journal of structural biology*, *138*(1-2), 137-144.
- Reznick, R. M., Zong, H., Li, J., Morino, K., Moore, I. K., Hannah, J. Y., ... & Befroy, D. (2007). Aging-associated reductions in AMP-activated protein kinase activity and mitochondrial biogenesis. *Cell metabolism*, *5*(2), 151-156.
- Rojo, M., Legros, F., Chateau, D., & Lombès, A. (2002). Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *Journal of cell science*, *115*(8), 1663-1674.
- Rollo, C. D. (2010). Aging and the mammalian regulatory triumvirate. *Aging and disease*, *1*(2), 105.
- Rose, G., Dato, S., Altomare, K., Bellizzi, D., Garasto, S., Greco, V., ... & BonaFe, M. (2003). Variability of the SIRT3 gene, human silent information regulator Sir2 homologue, and survivorship in the elderly. *Experimental gerontology*, *38*(10), 1065-1070.
- Rota, M., LeCapitaine, N., Hosoda, T., Boni, A., De Angelis, A., Padin-Iruegas, M. E., ... & Giorgio, M. (2006). Diabetes promotes cardiac stem cell aging and heart failure, which are prevented by deletion of the p66shc gene. *Circulation research*, *99*(1), 42-52.
- Rozemuller, A. J., van Gool, W. A., & Eikelenboom, P. (2005). The neuroinflammatory response in plaques and amyloid angiopathy in Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Current drug targets. CNS and neurological disorders*, *4*(3), 223-233.
- Rube, D. A., & van der Blik, A. M. (2004). Mitochondrial morphology is dynamic and varied. *Molecular and cellular biochemistry*, *256*(1-2), 331-339.
- Russwurm, M., Russwurm, C., Koesling, D., & Mergia, E. (2013). NO/cGMP: the past, the present, and the future. In *Guanylate Cyclase and Cyclic GMP* (pp. 1-16). Humana Press, Totowa, NJ.
- Sacksteder, C. A., Qian, W. J., Knyushko, T. V., Wang, H., Chin, M. H., Lacan, G., ... & Squier, T. C. (2006). Endogenously nitrated proteins in mouse brain: links to neurodegenerative disease. *Biochemistry*, *45*(26), 8009-8022.

- Samant, S. A., Zhang, H. J., Hong, Z., Pillai, V. B., Sundaresan, N. R., Wolfgeher, D., ... & Gupta, M. P. (2014). SIRT3 deacetylates and activates OPA1 to regulate mitochondrial dynamics during stress. *Molecular and cellular biology*, 34(5), 807-819.
- Sampath, P. D., & Kannan, V. (2009). Mitigation of mitochondrial dysfunction and regulation of eNOS expression during experimental myocardial necrosis by alpha-mangostin, a xanthonic derivative from *Garcinia mangostana*. *Drug and chemical toxicology*, 32(4), 344-352.
- Sánchez-Villamil, J. P., D'Annunzio, V., Finocchietto, P., Holod, S., Rebagliati, I., Pérez, H., ... & Carreras, M. C. (2016). Cardiac-specific overexpression of thioredoxin 1 attenuates mitochondrial and myocardial dysfunction in septic mice. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 81, 323-334.
- Sarti, P., Arese, M., Bacchi, A., Barone, M. C., Forte, E., Mastronicola, D., ... & Giuffrè, A. (2003). Nitric oxide and mitochondrial complex IV. *IUBMB life*, 55(10-11), 605-611.
- Sartorelli, V., & Puri, P. L. (2001). The link between chromatin structure, protein acetylation and cellular differentiation. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 6, D1024-47.
- Schaffer, S. W., & Suleiman, M. S. (Eds.). (2010). *Mitochondria: the dynamic organelle* (Vol. 2). Springer Science & Business Media.
- Schrader, M., Bonekamp, N. A., & Islinger, M. (2012). Fission and proliferation of peroxisomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1822(9), 1343-1357.
- Schriner SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, Coskun PE, Ladiges W, Wolf N, Van Remmen H, Wallace DC, Rabinovitch PS. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science*. Jun 24; 308(5730):1909-11, 2005.
- Schulz, T. J., Zarse, K., Voigt, A., Urban, N., Birringer, M., & Ristow, M. (2007). Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell metabolism*, 6(4), 280-293.
- Schwer, B., Bunkenborg, J., Verdin, R. O., Andersen, J. S., & Verdin, E. (2006). Reversible lysine acetylation controls the activity of the mitochondrial enzyme acetyl-CoA synthetase 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(27), 10224-10229.
- Schwer, B., Eckersdorff, M., Li, Y., Silva, J. C., Fermin, D., Kurtev, M. V., ... & Lombard, D. B. (2009). Calorie restriction alters mitochondrial protein acetylation. *Aging cell*, 8(5), 604-606.
- Schwer, B., North, B. J., Frye, R. A., Ott, M., & Verdin, E. (2002). The human silent information regulator (Sir) 2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase. *J Cell Biol*, 158(4), 647-657.

Seo, A. Y., Joseph, A. M., Dutta, D., Hwang, J. C., Aris, J. P., & Leeuwenburgh, C. (2010). New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more. *J Cell Sci*, *123*(15), 2533-2542.

Sesaki, H., & Jensen, R. E. (1999). Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *The Journal of cell biology*, *147*(4), 699-706.

Shaw, A. W., & Vosper, A. J. (1977). Solubility of nitric oxide in aqueous and nonaqueous solvents. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions I: Physical Chemistry in Condensed Phases*, *73*, 1239-1244.

Shenouda, S. M., Widlansky, M. E., Chen, K., Xu, G., Holbrook, M., Tabit, C. E., ... & Duess, M. A. (2011). Altered Mitochondrial Dynamics Contributes to Endothelial Dysfunction in Diabetes Mellitus Clinical Perspective. *Circulation*, *124*(4), 444-453.

Sherman, M. P., Aeberhard, E. E., Wong, V. Z., Griscavage, J. M., & Ignarro, L. J. (1993). Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits induction of nitric oxide synthase activity in rat alveolar macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*, *191*(3), 1301-1308.

Shi, T., Wang, F., Stieren, E., & Tong, Q. (2005). SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(14), 13560-13567.

Shimokawa, I., & Trindade, L. S. (2010). Dietary restriction and aging in rodents: a current view on its molecular mechanisms. *Aging and disease*, *1*(2), 89.

Shors, T. J., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, T., & Gould, E. (2001). Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*, *410*(6826), 372.

Short, K. R., Bigelow, M. L., Kahl, J., Singh, R., Coenen-Schimke, J., Raghavakaimal, S., & Nair, K. S. (2005). Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(15), 5618-5623.

Sisalli, M. J., Secondo, A., Esposito, A., Valsecchi, V., Savoia, C., Di Renzo, G. F., ... & Scorziello, A. (2014). Endoplasmic reticulum refilling and mitochondrial calcium extrusion promoted in neurons by NCX1 and NCX3 in ischemic preconditioning are determinant for neuroprotection. *Cell death and differentiation*, *21*(7), 1142

Smith, B. C., Underbakke, E. S., Kulp, D. W., Schief, W. R., & Marletta, M. A. (2013). Nitric oxide synthase domain interfaces regulate electron transfer and calmodulin activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(38), E3577-E3586.

Sohal, R. S., & Brunk, U. T. (1992). Mitochondrial production of pro-oxidants and cellular senescence. *Mutation Research/DNAging*, *275*(3-6), 295-304.

Sohal, R. S., Mockett, R. J., & Orr, W. C. (2002). Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis 1, 2. *Free Radical Biology and Medicine*, *33*(5), 575-586.

- Sone, K., Mori, M., & Mori, N. (2012). Selective upregulation of p66-Shc gene expression in the liver and brain of aged rats. *Archives of gerontology and geriatrics*, 55(3), 744-748.
- Souza, J. M., Peluffo, G., & Radi, R. (2008). Protein tyrosine nitration—functional alteration or just a biomarker?. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(4), 357-366.
- Spitz, D. R., & Oberley, L. W. (1989). An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Analytical biochemistry*, 179(1), 8-18.
- Stanbury, D. M., DeMaine, M. M., & Goodloe, G. (1989). Reactive dissolution of nitrogen dioxide in aqueous 15NO₂⁻: the first experimental determination of a main-group electron-exchange rate in solution. *Journal of the American Chemical Society*, 111(14), 5496-5498.
- Taguchi, N., Ishihara, N., Jofuku, A., Oka, T., & Mihara, K. (2007). Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *Journal of Biological Chemistry*, 282(15), 11521-11529.
- Tait, S. W., & Green, D. R. (2012). Mitochondria and cell signalling. *J Cell Sci*, 125(4), 807-815.
- Takehara, Y., Kanno, T., Yoshioka, T., Inoue, M., & Utsumi, K. (1995). Oxygen-dependent regulation of mitochondrial energy metabolism by nitric oxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 323(1), 27-32.
- Tatoyan, A., & Giulivi, C. (1998). Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 273(18), 11044-11048.
- Taupin, P. (2010). Aging and neurogenesis, a lesion from Alzheimer's disease. *Aging and disease*, 1(2), 158.
- Telford, J. E., Kilbride, S. M., & Davey, G. P. (2009). Complex I is rate-limiting for oxygen consumption in the nerve terminal. *Journal of Biological Chemistry*, 284(14), 9109-9114.
- Trinei, M., Giorgio, M., Cicalese, A., Barozzi, S., Ventura, A., Migliaccio, E., ... & Petronilli, V. (2002). A p53-p66Shc signalling pathway controls intracellular redox status, levels of oxidation-damaged DNA and oxidative stress-induced apoptosis. *Oncogene*, 21(24), 3872.
- Trojanowski, J. Q. (2003). Rotenone neurotoxicity: a new window on environmental causes of Parkinson's disease and related brain amyloidoses.
- Turrens, J. F., & Boveris, A. (1980). Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochemical Journal*, 191(2), 421-427.
- Turrens, J. F., Freeman, B. A., Levitt, J. G., & Crapo, J. D. (1982). The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. *Archives of biochemistry and biophysics*, 217(2), 401-410.
- Twig, G., & Shirihai, O. S. (2011). The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxidants & redox signaling*, 14(10), 1939-1951.

- Twig, G., Elorza, A., Molina, A. J., Mohamed, H., Wikstrom, J. D., Walzer, G., ... & Alroy, J. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *The EMBO journal*, *27*(2), 433-446.
- Van Heemst, D. (2010). Insulin, IGF-1 and longevity. *Aging and disease*, *1*(2), 147.
- Vaziri, H., Dessain, S. K., Eaton, E. N., Imai, S. I., Frye, R. A., Pandita, T. K., ... & Weinberg, R. A. (2001). hSIR2/SIRT1 functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *cell*, *107*(2), 149-159.
- Wang, M., Roberts, D. L., Paschke, R., Shea, T. M., Masters, B. S. S., & Kim, J. J. P. (1997). Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(16), 8411-8416.
- Wang, Y., & Marsden, P. A. (1995). Nitric oxide synthases: gene structure and regulation. In *Advances in pharmacology* (Vol. 34, pp. 71-90). Academic Press.
- Weindruch, R. (1996). The retardation of aging by caloric restriction: studies in rodents and primates. *Toxicologic pathology*, *24*(6), 742-745.
- Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature reviews Molecular cell biology*, *11*(12), 872.
- Willems, P. H., Rossignol, R., Dieteren, C. E., Murphy, M. P., & Koopman, W. J. (2015). Redox homeostasis and mitochondrial dynamics. *Cell metabolism*, *22*(2), 207-218.
- Yamamoto, T., Maruyama, W., Kato, Y., Yi, H., Shamoto-Nagai, M., Tanaka, M., ... & Naoi, M. (2002). Selective nitration of mitochondrial complex I by peroxynitrite: involvement in mitochondria dysfunction and cell death of dopaminergic SH-SY5Y cells. *Journal of neural transmission*, *109*(1), 1-13.
- Yeung, F., Hoberg, J. E., Ramsey, C. S., Keller, M. D., Jones, D. R., Frye, R. A., & Mayo, M. W. (2004). Modulation of NF- κ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *The EMBO journal*, *23*(12), 2369-2380.
- Yoneda, M., Chomyn, A., Martinuzzi, A., Hurko, O., & Attardi, G. (1992). Marked replicative advantage of human mtDNA carrying a point mutation that causes the MELAS encephalomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *89*(23), 11164-11168.
- Zamponi, N., Zamponi, E., Cannas, S. A., Billoni, O. V., Helguera, P. R., & Chialvo, D. R. (2018). Mitochondrial network complexity emerges from fission/fusion dynamics. *Scientific reports*, *8*(1), 363.
- Zhang, Y. H., Jin, C. Z., Jang, J. H., & Wang, Y. (2014). Molecular mechanisms of neuronal nitric oxide synthase in cardiac function and pathophysiology. *The Journal of physiology*, *592*(15), 3189-3200.

Bibliografía

Zhao, G., Cao, K., Xu, C., Sun, A., Lu, W., Zheng, Y., ... & Lu, Z. (2017). Crosstalk between Mitochondrial Fission and Oxidative Stress in Paraquat-Induced Apoptosis in Mouse Alveolar Type II Cells. *International journal of biological sciences*, 13(7), 888.

Zorzano, A., & Claret, M. (2015). Implications of mitochondrial dynamics on neurodegeneration and on hypothalamic dysfunction. *Frontiers in aging neuroscience*, 7, 101.

Zorzano, A., Liesa, M., Sebastián, D., Segalés, J., & Palacín, M. (2010, August). Mitochondrial fusion proteins: dual regulators of morphology and metabolism. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 21, No. 6, pp. 566-574). Academic Press.

Zou, M., Martin, C., & Ullrich, V. (1997). Tyrosine nitration as a mechanism of selective inactivation of prostacyclin synthase by peroxynitrite. *Biological chemistry*, 378(7), 707-714.

2 RESUMEN

A medida que la expectativa de vida de la población aumenta, también lo hace la prevalencia del deterioro cognitivo, las enfermedades neurodegenerativas y la demencia, saturando y colapsando los sistemas sociales y de salud. Según la OMS, un gran porcentaje de los adultos mayores de 85 años sufren alguna patología asociada a la edad (Alzheimer, Parkinson, etc.), por lo que es fundamental comprender los mecanismos del deterioro cognitivo durante el envejecimiento. El desarrollo de este tipo de patologías debe entenderse en el contexto de la biología molecular del proceso de envejecimiento. La función mitocondrial disminuye en el proceso de envejecimiento normal aumentando la incidencia de trastornos neurodegenerativos relacionados con la edad.

Muchas de las funciones fisiológicas de nuestro cuerpo son establecidas o controladas por nuestro cerebro. El cerebro es el órgano más complejo en el cuerpo humano. Es el centro de nuestro sistema nervioso y orquesta muchos procesos necesarios para el mantenimiento de la homeostasis y las acciones físicas. Comprender cómo envejece el cerebro humano e identificar los mecanismos por el que se desarrolla este proceso puede ser crucial para retrasar o revertir el envejecimiento saludable de todo el cuerpo. En el cerebro humano, el declive de la función mitocondrial puede afectar selectivamente a poblaciones neuronales con grandes demandas bioenergéticas, como las grandes neuronas piramidales que degeneran y conducen al Alzheimer. Por lo tanto, la disminución de la función mitocondrial puede contribuir al envejecimiento del cerebro y hacer que las neuronas sean vulnerables a las patologías dependientes de la edad.

Si bien los mecanismos reales que subyacen a la extensión de la esperanza de vida en estos modelos experimentales no están del todo claros, una hipótesis es que la función eficiente de la cadena de transporte de electrones reduce la generación y liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) dañinas para la célula. Esta teoría propuesta por el Dr Harman en 1956, atribuye el proceso de envejecimiento al daño oxidativo causado por la generación de ROS derivadas de la respiración mitocondrial cuando el O_2 se reduce parcialmente. Esta no es la única teoría que intenta explicar el envejecimiento ya que las teorías de senescencia programada proponen que el mismo es el resultado de la activación e inhibición de ciertos genes de acuerdo

a un patrón de desarrollo normal definido para cada organismo, siendo ésta la última etapa dentro de una secuencia de eventos codificados en el genoma

Hasta el día de hoy, la teoría del envejecimiento programado y la del daño por estrés oxidativo han sido tradicionalmente concebidas como escuelas de pensamiento independientes. Sin embargo, p66shc ha demostrado que los genes reguladores del envejecimiento y las ROS están estrechamente interconectados, ya que su ausencia modifica la homeostasis metabólica al proporcionar resistencia al estrés oxidativo y promover la longevidad. Los ratones p66^{shc(-/-)} son una oportunidad única para comprender mejor la relación bidireccional entre la homeostasis redox y el desequilibrio de la biogénesis y la dinámica mitocondrial observado en el envejecimiento.

A su vez, la función y estructura mitocondrial es modulada por la exposición al óxido nítrico. El NO, radical relativamente poco reactivo, sirve como molécula mensajera en una variedad de sistemas fisiológicos y tiene la capacidad de formar especies de radicales tóxicos, como el peroxinitrito (ONOO⁻), que puede causar daño nitrosativo en biomoléculas, fallo de la degradación proteosómica, inhibición de la actividad enzimática e interferencia general de las funciones reguladoras. Todos estos fenómenos tienen lugar durante el envejecimiento, cuando aumentan los niveles de ROS y el anión superóxido (O₂⁻) se conjuga con NO para formar especies reactivas del nitrógeno y sus productos nitrato (NO₃⁻), nitrito (NO₂⁻) y peroxinitrito (ONOO⁻) que conllevan al daño, a la pérdida de funciones biológicas y finalmente a la muerte. Altos niveles de ROS/RNS se han asociado a modificaciones postraduccionales inducidas por redox (es decir, oxidación, nitración, S-nitrosilación, etc.) en varias de las proteínas asociadas al mantenimiento de la estructura y de la homeostasis mitocondrial, favoreciendo el desbalance entre estos procesos que conllevan a la pérdida de funciones biológicas en el envejecimiento.

Por otra parte, se ha observado que individuos centenarios poseen altos niveles de expresión de Sirt3 y que los cambios observados en el perfil de acetilación de las proteínas o “acetiloma” están relacionados con el envejecimiento normal y las enfermedades neurodegenerativas vinculadas a la edad. Sirt3, miembro de la familia de las desacetilasas dependientes de NAD, es la sirtuina de localización mitocondrial más estudiada y es asociada al mantenimiento de la homeostasis metabólica y a la modulación de la desacetilación de varias proteínas que participan en su regulación. Si bien las bases moleculares y los mecanismos que conducen al aumento de la esperanza de vida aún no están claros, uno de los atributos más

interesantes de esta enzima es que se la considera un elemento importante para el retraso de la pérdida de funciones biológicas durante el envejecimiento.

Nuestra hipótesis es que durante el envejecimiento, las ROS/RNS podrían modular la expresión y actividad de proteínas mitocondriales clave para el mantenimiento de la homeostasis celular como la desacetilasa Sirt3, coordinando la biogénesis mitocondrial y el balance entre fusión/fisión de dichas organelas en el cerebro de ratones p66^{shc^{-/-}}. Y nuestro objetivo es profundizar en la relación bidireccional entre la homeostasis redox y los genes reguladores de la senescencia en un modelo de envejecimiento saludable, analizando cómo los cambios en el metabolismo oxidativo/nitrosativo de los ratones p66^{shc^{-/-}} influyen en el equilibrio de la dinámica mitocondrial y en la actividad de Sirt3.

En este estudio, demostramos que las mitocondrias de tejido nervioso de ratones p66^{shc^{-/-}} envejecidos presentan una menor alteración del equilibrio redox y que existe un fuerte vínculo entre las especies reactivas de nitrógeno, la función, la morfología y la biogénesis mitocondrial. También demostramos que la actividad de la desacetilasa Sirt3 es modulada por su estado de nitración y que dicha actividad en ratones p66^{shc^{-/-}} se ve potenciada durante el envejecimiento por la mayor biodisponibilidad de NAD observada en mitocondrias de tejido nervioso.

ABSTRACT

Programmed and damage aging theories have traditionally been conceived as stand-alone schools of thought. However, p66shc adaptor protein has demonstrated that aging-regulating genes and reactive oxygen species (ROS) are closely interconnected, since its absence modifies metabolic homeostasis by providing oxidative stress resistance and promoting longevity. p66^{shc(-/-)} mice are a unique opportunity to further comprehend the bidirectional relationship between redox homeostasis and the imbalance of mitochondrial biogenesis and dynamics during aging. This study shows that brain mitochondria of p66^{shc(-/-)} aged mice exhibit a reduced alteration of redox balance with a decrease both in ROS generation and its detoxification activity. We also demonstrate a strong link between reactive nitrogen species (RNS) and mitochondrial function, morphology and biogenesis, where low levels of ONOO- formation present in aged p66^{shc(-/-)} mice brain prevent protein nitration delaying loss of biological functions characteristic of the aging process. Sirt3 modulates age-associated mitochondrial biology and function via lysine deacetylation of target proteins and we show that its regulation depends on its nitration status and is benefited by the improved NAD⁺/NADH ratio in aged p66^{shc(-/-)} brain mitochondria. Low levels of protein nitration and acetylation could cause the metabolic homeostasis maintenance observed during aging in this group, thus increasing its lifespan.